



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Unidad de Posgrado**

## **Detección del alelo delta F508 del gen *cftr* en familias con parientes diagnosticados con fibrosis quística en**

**Lima**

### **TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Química Clínica

### **AUTOR**

**Gustavo Antonio GUERRA BRIZUELA**

### **ASESOR**

**Amparo ZAVALA PESANTES**

Lima, Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR  
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA CLÍNICA**

Siendo las 10:00 hrs. del 04 de diciembre 2015 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. María Elizabeth Gonzáles Loayza e integrado por los siguientes miembros: Dra. Luisa Pacífica Negrón Ballarte, Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (Asesora), Dr. Eduardo Flores Juárez y la Dra. María Elena Salazar Salvatierra; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"DETECCIÓN DEL ALELO DELTA F508 DEL GEN *cftr* EN FAMILIAS CON PARIENTES DIAGNOSTICADOS CON FIBROSIS QUÍSTICA EN LIMA"** presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica **GUSTAVO ANTONIO GUERRA BRIZUELA**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Química Clínica**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

*diecinueve, excelente*

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **GUSTAVO ANTONIO GUERRA BRIZUELA**, el Grado Académico de **Magíster en Química Clínica**.

Siendo las *11:50* hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las *12* hrs. del 04 de diciembre 2015.

*M. Elizabeth Gonzáles*  
Dra. María Elizabeth Gonzáles Loayza (P.P., D.E.)  
Presidenta

*Luisa*  
Dra. Luisa Pacífica Negrón Ballarte (P.P., D.E.)  
Miembro

*Amparo*  
Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P.P., T.C.)  
Miembro - Asesora

*Eduardo*  
Dr. Eduardo Flores Juárez (P.P., T.C.)  
Miembro

*María Elena*  
Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P. Asoc., T.C.)  
Miembro

Observaciones:

## **DEDICATORIA**

A Dios por brindarme la luz y la fuerza  
necesaria, para seguir por el camino correcto.

A mis hijos: Ana Patricia, Gustavo, Silvia, Cristina y  
Verónica que fueron, son y serán siempre el estímulo y  
la razón de mi existencia.

A mis padres: Gustavo Guerra y Glicería Brizuela  
por todo el amor, apoyo y sabiduría que hicieron posible  
poder concluir una etapa importante en mi vida.

A mis queridos colegas y amigos que siempre me acompañan, en especial:

Dra. Haydeé Zúñiga, Dra. Elizabeth Gonzales, Dra. Gloria Gordillo  
y Q.F. Luz Kathia Hernández.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento especial a la Dra. Amparo Zavaleta por su asesoría, constante apoyo y consejos.

Al Jurado Examinador, por la sapiencia, la dedicación, el apoyo y el tiempo oportuno brindado para la sustentación del presente trabajo, conformado por los Doctores:

Presidenta: Dra. María Elizabeth Gonzales Loayza

Miembros:

Dra.: Luisa Pacífica Negrón Ballarte

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes

Dr. Eduardo Flores Juárez

Dra. María Elena Salazar Salvatierra.

Un agradecimiento es especial a Elizabeth Chávez por su apoyo en el desarrollo de la parte experimental.

# ÍNDICE

## RESUMEN

## SUMMARY

## ABREVIATURAS

### I. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática.....	1
1.2. Formulación del problema.....	3
1.3. Justificación.....	3
1.4. Justificación teórica.....	3
1.5. Justificación practica.....	4
1.6. Objetivos.....	5
1.6.1. Objetivo General.....	5
1.6.2. Objetivos Específicos.....	5

### II. MARCO TEORICO

2.1. Marco epistemológico de la investigación.....	6
2.2. Antecedentes históricos de la fibrosis quística.....	8
2.3. La Fibrosis Quística.....	11
2.3.1. CFTR: gen y proteína.....	12
2.3.1.1 Formación y estructura de la CFTR.....	12
2.3.1.2 Función de la CFTR.....	14
2.3.2. Mutaciones de la FQ.....	16
2.3.2.1 Clasificación de las mutaciones de la CFTR.....	20
A. Clase I : Defecto en la síntesis de la CFTR.....	20
B. Clase II : Defecto en el procesamiento.....	20
C. Clase III : Defecto en la regulación.....	21
D. Clase IV: Defecto en la conductancia.....	22
E. Clase V : Defecto parcial en la producción o en el procesamiento.....	22

F. Clase VI: Defecto en la regulación de otros canales.....	22
2.3.2.2. Correlación Genotipo-Fenotipo.....	23
2.3.3. Fisiopatología de la fibrosis quística.....	24
2.3.4. Manifestaciones clínicas.....	29
Aparato respiratorio.....	29
Aparato gastrointestinal.....	30
Malnutrición .....	31
Afectación del aparato genitourinario.....	32
Alteración de la función de las glándulas sudoríparas.....	32
Complicación en otros órganos.....	32
2.3.5. Mutaciones $\Delta F508$ .....	33
2.3.6. Factores modificadores.....	34
Factores Ambientales.....	35
Factores Genéticos.....	37
2.4. Aspectos diagnósticos.....	42
Test del sudor.....	47
Diagnostico neonatal.....	51
Diagnostico en la edad adulta.....	51
Diagnostico molecular.....	52
Pruebas complementarias.....	53
2.5. Reacción en cadena de la polimerasa.....	53
2.5.1 Aplicaciones en Medicina Interna.....	62

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio.....	66
3.2. Universo.....	66
3.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	66
3.3.1. Población.....	66
3.3.2. Criterios de inclusión.....	66
3.3.3. Criterios de exclusión.....	66

3.3.4. Técnica de muestreo.....	67
3.4. Muestra biológica.....	67
3.5. Lugar de ejecución del estudio.....	67
 3.6. MÉTODOS	
3.6.1. Genotipificación de la mutación $\Delta F508$ .....	67
3.6.1.1. Extracción y purificación del ADN genómico.....	67
3.6.1.2. Amplificación del exon 10 del gen <i>cfr</i> .....	68
3.6.1.3. Restricción de los productos amplificado.....	69
3.6.2. Análisis de los productos de restricción.....	69
3.6.3. Determinación de parámetros bioquímicos.....	70
 <b>IV. RESULTADOS</b>	
4.1. Pacientes.....	74
4.2. Extracción de ADN genómico.....	74
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa.....	74
4.3.1. Productos de PCR y digestión .....	74
4.4. Determinaciones bioquímicas.....	77
 <b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>84</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>87</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>88</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>89</b>

## **LISTA DE CUADROS**

Cuadro 1. Frecuencia de haplotipos y de mutaciones en el gen CTFR.....Página 19



## LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1. Fisiopatología intestinal.....	Página 26
Tabla N° 2. Manifestaciones clínicas de la FQ.....	Página 33
Tabla N° 3 Características clínicas más frecuentes agrupadas según edad	Página 43
Tabla N° 4. Criterios diagnósticos de la FQ.....	Página 44
Tabla N° 5. Criterios diagnósticos de la FQ Clásica o típica.....	Página 47
Tabla N° 6. Criterios diagnósticos de la FQ Clásica o atípica.....	Página 47
Tabla N° 7. Alteraciones cromosómicas en el albinismo.....	Página 65
Tabla N° 8. Frecuencia alélica relativa de la mutación $\Delta F508$ en familiares de pacientes diagnosticados con FQ .....	Página 76
Tabla N° 9. Frecuencia genotípica y alélica relativa de la mutación $\Delta F508$ en familiares de pacientes diagnosticados con FQ .....	Página 76
Tabla N° 10. Perfil lipídico y concentración de glucosa en familiares de pacientes con fibrosis quística. ....	Página 77
Tabla N° 11. Correlacion del perfil lipídico e Índice aterogenico en f a m i l i a r e s de pacientes con FQ.....	Página 78
Tabla N° 12. Estadística descriptiva de familiares de pacientes con fibrosis quísticas provenientes de la provincia de Lima según sexo, edad y parámetros bioquímicos.....	Página 78
Tabla N° 13. Frecuencia relativa porcentual en familiares de pacientes con FQ según niveles de colesterol.....	Página 82
Tabla N° 14. Correlacion del perfil lipídico e Índice aterogenico en f a m i l i a r e s de pacientes con FQ.....	Página 82
Tabla N° 15. Frecuencia relativa porcentual en f a m i l i a r e s de pacientes con FQ. Según niveles de trigliceridos.....	Página 83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación gen de fibrosis.....	Página 2
Figura 2. Representación del gen y la proteína CFTR.....	Página 13
Figura 3. Modelo estructural simplificado del canal de cloro CFTR.....	Página 15
Figura 4. Mutaciones que afectan el gen CFTR.....	Página 16
Figura 5. Distribución en diferentes poblaciones de las mutaciones FQ.....	Página 17
Figura 6. Consecuencias moleculares de las mutaciones.....	Página 20
Figura 7. Clases de mutaciones en el gen CFTR. ....	Página 21
Figura 8. Estructura propuesta para la proteína CFTR.....	Página 28
Figura 9. Representación de la proteína CFTR en la membrana celular.....	Página 29
Figura 10. Ubicación de la Mutación $\Delta F508$ .....	Página 34
Figura 11. La interacción entre los factores que contribuyen a las manifestaciones clínicas.....	Página 41
Figura 12. Algoritmos sobre la metodología diagnóstica.....	Página 45
Figura 13. Algoritmo, que parte del resultado del estudio genético .....	Página 46
Figura 14. La reacción en cadena de la polimerasa tiene tres etapas .....	Página 54
Figura 15. Descripción del proceso de un PCR en los primeros ciclos de reacción.....	Página 59
Figura 16. En una reacción de PCR los fragmentos se amplifican en forma exponencial.....	Página 60
Figura 17. Los PCR que amplifican zonas no conocidas.....	Página 62
Figura 18. Gel de agarosa al 1% mostrando ADN genómico extraído con el método de solventes orgánicos .....	Página 74
Figura 19. Gel agarosa al 1% conteniendo los productos de amplificación	Página 75
Figura 20. Gel agarosa al 3% conteniendo los productos de digestión.....	Página 75
Figura 21. Distribución de familiares de pacientes con fibrosis quística provenientes de la provincia de Lima según edad.....	Página 80
Figura 22. Distribución porcentual de familiares de pacientes con fibrosis quísticas provenientes de la provincia de Lima según sexo y parámetros bioquímicos.....	Página 81

**RESUMEN CON PALABRAS CLAVES O DESCRIPTORES**

<b>FQ</b>	: Fibrosis Quística
<b>CFTR</b>	: Proteína Reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
<b>ADN</b>	: Acido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	: Acido ribonucleico
<b>dNTP</b>	: Desoxinucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	: Etilen diamino tetra acético
<b>NADH</b>	: Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
<b>pb</b>	: Pares de bases
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la Polimerasa)
<b>RFLP</b>	: Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción)
<b>STE</b>	: Sodio tris EDTA
<b>TAE</b>	: Tris acetato
<b>EDTA TBE</b>	: Tris borato EDTA
<b>U</b>	: Unidades
<b>v</b>	: Volumen
<b>Mbo I</b>	: Enzima de restricción procedente de <i>Moraxella bovis</i>

## RESUMEN

En este trabajo se determinó el alelo  $\Delta F508$  del gen *cfr* en familias de pacientes diagnosticados con fibrosis quística (FQ) en Lima. El grupo que participa pertenece a La Asociación Nacional Contra la Fibrosis Quística. Se estudiaron 21 personas pertenecientes a seis familias. En cada caso, los familiares adultos y los padres de los menores de edad firmaron un consentimiento informado, previo a su inclusión en el estudio. Después, se recolectaron muestras de sangre venosa para extraer ADN genómico de los leucocitos y se amplificaron regiones específicas del gen *cfr* por la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos diseñados para detectar la mutación  $\Delta F508$  en el exón 10. Los productos amplificados fueron cortados con la enzima *MboI*. La frecuencia del alelo  $\Delta F508$  fue de 11.09 %, distribuidos en un homocigoto  $\Delta F508$  y tres heterocigotos  $\Delta F508/X$ . El resto de familiares no presentó la mutación  $\Delta F508$ . La frecuencia del alelo  $\Delta F508$  en esta muestra es menor a la reportada en países europeos pero en América Latina se ha observado una gran heterogeneidad debido a los diferentes patrones de mestizaje. Además se realizaron el perfil lipídico y determinación de glucosa.

**Palabras Clave:** Fibrosis Quística, gen *cfr*, Mutación  $\Delta F508$ , RFLP- PCR.

## SUMMARY

In this paper AF508 allele of the CFTR gene in families of patients diagnosed with cystic fibrosis (CF) in Lima we were determined. The group participates belongs to The National Association Against Cystic Fibrosis. 21 people from six families were studied. In each case, the family adults and parents of minors signed an informed consent prior to inclusion in the study consent. After, venous blood samples were collected for extracting genomic DNA from leukocytes and specific regions of the CFTR gene by polymerase chain reaction with specific primers designed to detect the mutation in exon 10. AF508 amplified the amplified products were cut with the enzyme MboI. AF508 allele frequency was 11.90 %, distributed in a homozygous and three heterozygous F508/X. The rest of the family did not show the mutation AF508. AF508 allele frequency in this sample is lower than that reported in European countries but in Latin America there has been a great heterogeneity due to different patterns of miscegenation. Besides the lipid profile and glucose determination is made.

Keywords: Cystic Fibrosis, cftr gene mutation F508, RFLP- PCR

## **I.INTRODUCCION**

### **1.1 SITUACION PROBLEMÁTICA.**

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética con herencia autosómica recesiva, es decir, un individuo debe tener mutaciones con pérdida de función en ambas copias de su gen CFTR para manifestar la enfermedad. La incidencia de la enfermedad es de alrededor 1:3.300 recién nacidos vivos en las poblaciones definidas como caucásicas y la frecuencia de portadores sanos de una mutación (no identificables por síntomas clínicos ni por elevaciones en el test de sudor) es de 1:25.(Vaglio, A, et al.,2011)

Las manifestaciones más frecuentes de la enfermedad son la insuficiencia pancreática exocrina en alrededor del 85-90% de los casos, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica grave característica, que se desarrolla con el tiempo en casi todos los casos, la azoospermia obstructiva por anomalías anatómicas en el tracto urogenital en la casi totalidad de los varones, y altas concentraciones de cloro y sodio en el sudor en más del 98% de los casos.( Vázquez,C & Baranda, F 2012).

La presentación clínica tiene gran variabilidad , por ello se han establecido criterios diagnósticos tales como: presentar una o más características fenotípicas de FQ, o historia de FQ en hermanos o primos hermanos, o un examen de pesquizado neonatal positivo para FQ (elevación de los niveles séricos de tripsina inmunoreactiva) junto a un incremento en la concentración de Cl<sup>-</sup> en sudor mayor de 60 meq/L utilizando la técnica de Iontoforesis con Pilocarpina en dos o más ocasiones, o identificación de mutaciones en ambos alelos del gen de FQ, o diferencia de potencial nasal alterado.( Torres, D.,2002, pp 7- 15), (Tori, C.A.,1966)

Los criterios clásicos de diagnóstico de la enfermedad son: la constatación de una concentración de cloro en el sudor, mediante QPiT, superior a 60 mmol/L, junto con uno o más de los siguientes rasgos: insuficiencia pancreática exocrina, enfermedad pulmonar sugestiva, o historia de FQ en hermanos o primos hermanos.(Vázquez,C & Baranda, F.,2012).

En 1985, el gen *cftr* fue identificado localizándose en 7q 31.3, indicando que se encuentra en el cromosoma 7, brazo largo, región 3, banda 1.3 (Fig. 1). (Morales, P & Sánchez, E, 2012). y fue clonado en 1989 (Aguirre I, et al., 1994 y Collazo T, et al., 2004) mide 250 kilobases (kb), tiene 27 exones y codifica una proteína llamada reguladora de la conductancia transmembrana de FQ (*cftr*), que funciona como un canal de cloro. (Cuppens H, 2012).

A la fecha se han reportado más de 1000 mutaciones asociadas con la enfermedad. A nivel mundial, la mutación génica más frecuente es la denominada  $\Delta F508$  con 66 %, que consiste en la delección de 3 pares de bases (pb) en el gen *cftr*, resultando en la pérdida de la fenilalanina en la posición 508 de la proteína.



En Perú, según el censo del 2007, se registró una población de 28 220 764 habitantes y se estimó una tasa de natalidad de 20 por cada 1000 habitantes (INEI, 2008), tomando como incidencia 1 en 9000 de los recién nacidos vivos, hijos de hispanos en los Estados Unidos se estima que nacerán anualmente 71 niños con FQ en Perú. (Silva, 2008).

El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia alélica, de la mutación  $\Delta F508$ , en el gen *cftr* de familiares de pacientes diagnosticados con fibrosis quística (FQ) inscritos en la Asociación Nacional contra la Fibrosis Quística. Para ello se utilizó la técnica de polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción del gen *cftr* previamente amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

## 1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA

De acuerdo a los antecedentes tendrá variaciones significativas la frecuencia alélica de la mutación  $\Delta F508$  en el gen *cfr* de familiares de pacientes diagnosticados con FQ en la ciudad de Lima.

## 1.3. JUSTIFICACION

## 1.4. JUSTIFICACION TEORICA

Se ha reportado que en la población caucásica la incidencia es de esta enfermedad es de 1 en 2570 nacimientos. Sin embargo se debe tener en cuenta que la incidencia difiere según los distintos grupos raciales, probablemente como reflejo de una historia diferente. En los Estados Unidos, 1 de cada 4.000 niños nacen con fibrosis quística. En este país el estudio de la distribución de la enfermedad por raza permitió comprobar que la misma afecta a alrededor de 1/3.300 nacidos vivos para niños de raza blanca, a 1/15.300 nacidos vivos de niños de raza negra y a 1/32.000 de origen asiático. En España la incidencia se estima en 1 de 4.500 nacimientos y en Irlanda 1 de cada 1.353, lo cual corresponde a la mayor incidencia mundial. En la Argentina, los últimos datos reportados por el Programa de Pesquisa Neonatal de Fibrosis Quística en el año 2008 indican una incidencia de 1 caso en 6.775 nacimientos, pero es muy probable que sólo el 50% de todos los casos hayan sido considerados. (Martina, P, 2013).

La mutación  $\Delta F508$  es responsable del 60% de los enfermos FQ en el mundo. Esta mutación es responsable de formas muy severas (aquellas acompañadas de insuficiencia pancreática). En la mayor parte de los pacientes aparecen los primeros síntomas durante la lactancia, es decir, con menos de 1 año de edad (Dyce, 2000).

La frecuencia de esta mutación en la población mundial es de 66 % (Araújo, 2005). Esta mutación provoca una alteración en el proceso post-transcripcional de la proteína, con una disminución del tráfico de la proteína madura desde el aparato de Golgi a la superficie celular apical (Loo, 1998). Se encuentra aproximadamente en el 70 % de los cromosomas fibroquísticos en Estados Unidos y Canadá, si bien varía su incidencia, dependiendo del grado de heterogeneidad genética en las distintas poblaciones (Murray, 1999; García, 1999). Está presente con un máximo de incidencia en Dinamarca de 87,2 %, un mínimo en Turquía de 21,3 %, (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1990; European



Working Group on CF Genetics, 1990; Estivill, 1997). Pocas han sido las publicaciones de FQ en América Latina; al ser principalmente una combinación de tres poblaciones: Indios americanos, africanos y caucásicos, su incidencia varía en los diferentes países: 45 % en México (Villalobos, 1997); 50,8 % en Brasil (Maróstica 1998; Bernardino, 2000); entre 57 % y 60,9 % en Argentina (Luna, 1997); en Uruguay es de un 40 % (Luzardo, 2001) y en Cuba se reporta un 34 % (Collazo, 1995).

Hay otras mutaciones poco frecuentes que están restringidas a determinadas regiones geográficas o grupos étnicos como la 3120+1 G®A, que con un cuadro clínico similar a la mutación  $\Delta F508$ , se presenta en pacientes homocigóticos con una insuficiencia pancreática severa y síntomas respiratorios con un patrón clínico severo que conduce a la muerte precoz (Carles, 1996). Esta mutación ha sido caracterizada como una mutación relativamente común en las poblaciones sudafricanas y consiste en la ruptura del sitio 5' de empalme en el intrón 16 del CFTR.

La FQ es muy rara en poblaciones negras de África, quienes tienen una mezcla mínima con la raza blanca. Sólo unos pocos casos han sido reportados y muy pocos han sido estudiados a escala molecular. El investigador Padoa (1999) realizó un estudio en Sudáfrica con una muestra de 1360 sujetos aparentemente saludables no relacionados detectándose nueve portadores de la mutación y en un estudio de sujetos enfermos se concluyó que dos de cada cinco pacientes negros fibroquísticos dieron positivos a la prueba de electrolitos en sudor y son heterocigóticos para dicha mutación donde se obtuvo una frecuencia de portadores de 1/91 en sudafricanos negros, hallándose la mutación entre el 15-65 % de los cromosomas fibroquísticos de esta población. También Padoa (1999) y otros investigadores encontraron un individuo de origen camerunés con un cromosoma que contenía la mutación 3120+1G®A.( Roldán A.M ,2013).

## **1.5. JUSTIFICACION PRÁCTICA**

La importancia de identificar los portadores sanos que se encuentran en riesgo de transmitir la enfermedad, radica en poder ofrecer un adecuado asesoramiento genético que les permita optar por opciones reproductivas conducentes a prevenir la aparición de nuevos casos o al tratamiento temprano de los afectados, y se justifica por el alto impacto económico y social que representa para una familia un hijo con FQ. El costo del tratamiento

básico de un niño con FQ para el Sistema de Salud, se calculó en Estados Unidos como \$10,000 dólares/año, suma que asciende a \$40,000 dólares, si se tiene en cuenta el valor de las repetidas hospitalizaciones.

Si se considera que un diagnóstico de portadores tiene un precio que oscila entre \$50 y \$150 dólares, es claro el beneficio que trae identificar estas personas, más aún si esta acción primaria repercute en bajar la incidencia de la enfermedad lo que disminuiría hasta en 90% los costos para el sistema de seguridad social de un país (Mateus H, et al, 2007).

## **1.6. OBJETIVOS**

### **1.6.1. Objetivo General:**

Determinar la frecuencia alélica de la mutación  $\Delta F508$  en el gen *cfr* de familiares de pacientes diagnosticados con FQ en la ciudad de Lima.

### **1.6.2. Objetivos Específicos:**

- Identificar los individuos portadores del alelo  $\Delta F508$  para la enfermedad.
- Estandarizar la técnica RFLP-PCR
- Determinar los perfiles lipídicos de los familiares participantes.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los familiares de pacientes con FQ.

## **II. MARCO TEORICO**

### **2.1. MARCO EPISTEMOLOGICO DE LA INVESTIGACION**

A partir del año 2001, fecha oficial en la que se completó el mapa del genoma humano, vienen creciendo de manera exponencial los hallazgos de mutaciones específicas en los genes y su correlación con enfermedades, síndromes clínicos, predisposiciones patológicas e incluso, asociaciones con conductas sociales consideradas indeseables. Esta tendencia en la medicina actual está transformando los paradigmas conocidos y tradicionales de la práctica médica y su interpretación nosológica.

Aunque todavía son vigentes los modelos anatomoclínico, fisiopatológico y etiopatogénico de las enfermedades, cada vez es más común que en las revistas clásicas de especialidades médicas, además de las revistas de ciencias básicas, se publiquen artículos que asocian los hallazgos defectuosos del genoma de los distintos eventos clínicos, hasta el punto que ya comienzan a plantearse nuevas clasificaciones nosológicas basadas en el cromosoma afectado, más que en nexos clínicos, patológicos o anatómicos. Por ejemplo, hablamos ya de enfermedades o síndromes del cromosoma 1, 2, 3, X, etc., en la cual cada entidad tiene una nomenclatura exacta de acuerdo con el gen afectado y su ubicación en el brazo corto o largo y los locis y segmentos alterados.

Es decir, se comienza a dar un cambio paradigmático en el que clasificamos de acuerdo con el genoma, y no al fenotipo (que es la base de clasificación de los tres modelos tradicionales, pues el concepto de fenotipo incluye la totalidad del cuerpo, no sólo lo visible a los sentidos). El nuevo modelo nosológico es el paradigma genómico, que implica, por primera vez, la definición, clasificación y comprensión de las enfermedades humanas independiente de su manifestación y presencia en el cuerpo.

Verdadera revolución que en su desarrollo pleno terminará o modificará, en profundidad, todos los fundamentos conocidos de la medicina clínica, empezando por la disciplina central de la semiología, pues la medicina pasa de una fase diagnóstica de patologías ya establecidas en el organismo, a una fase predictiva de probabilidades o certezas de aparición de las enfermedades.

Además de las enfermedades genéticas de causa monogenética, hoy existe un consenso científico que establece que todas las enfermedades humanas tienen una base genética,

aunque están implicados múltiples genes y éstos, a la vez, tienen relaciones constitutivas con cofactores ambientales desconocidos en su mayoría. Sin embargo, se están estableciendo los nexos entre determinadas mutaciones de genes específicos y la mayor probabilidad de aparición de ciertas enfermedades o estados patológicos.

En este contexto la lista de alteraciones genéticas asociadas a patologías específicas ya es muy grande, aunque el estado de conocimiento de estos nexos varía mucho y por ello es fundamental tener prudencia en la interpretación de los datos y en sus ulteriores recomendaciones.

Aproximadamente en el 75% de todos los pacientes a nivel mundial, la mutación más común es la  $\Delta F508$ , que lleva a una delección de la fenilalanina en la posición 508 de la proteína CFTR. (Martina, P, 2013).

Aunque la mutación  $\Delta F508$  se presenta en el 70% de los pacientes con fibrosis quística, existen más de 600 mutaciones conocidas (Torres, D, 2002).

Este hecho, permite plantear algunas reflexiones generales en relación con las pruebas de predisposición de enfermedades:

- a. Estas pruebas deben ser voluntarias, individualizadas, con una consejería genética previa detallada que haga comprender a la persona la relación entre probabilidad y certeza del examen y la manifestación de la enfermedad.
- b. No se deberían indicar cribados masivos hasta no tener un conocimiento suficiente de los falsos positivos y los falsos negativos de las pruebas.
- c. No se deberían recomendar protocolos de prevención radicales e intervencionistas a portadores de las mutaciones, hasta que no exista un consenso científico que considere que ya se conocen todos los cofactores ambientales que pueden mejorar o empeorar la correlación entre la mutación identificada y el desarrollo de la enfermedad.
- d. Respetar el principio de confidencialidad del resultado de la prueba.

Con el desarrollo de las pruebas de medicina predictiva se han incrementado, de manera exponencial, las posibilidades de diagnosticar múltiples anomalías de causa genética.

No obstante, fuera de los beneficios obvios para la medicina científica, también es fundamental reconocer la existencia de algunos riesgos:

1. El diagnóstico de muchas de estas enfermedades no tendrá, al principio, una correlación con la existencia de terapias exitosas, llevando a la medicina contemporánea a un nuevo nihilismo terapéutico.
2. Las nuevas definiciones de “pacientes presintomáticos” y de “enfermos potenciales” pueden generar discriminaciones laborales, sociales y personales en los individuos que se sometan a las pruebas predictivas.
3. Las recomendaciones clínicas a las personas, con diagnósticos de probabilidad, deben ser prudentes y conservadoras, hasta que no se posea un conocimiento exacto del valor predictivo de dichas pruebas.
4. Las pruebas de medicina predictiva deben conservarse dentro del ámbito del respeto a la autonomía de las personas, y sería inaceptable que condujera a programas de cribado masivo de carácter obligatorio.

## **2.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA FIBROSIS QUÍSTICA.**

El gen de la Fibrosis Quística (FQ) pudo aparecer hace aproximadamente unos 52.000 años, según los trabajos de X. Estivill, aunque no hay testimonios tan antiguos de la enfermedad.

Las primeras observaciones sobre esta entidad patológica se recogen en el folclore popular del Norte de Europa, en las que se aseguraba que los niños que al besarlos tenían un sabor salado estaban embrujados y morirían prematuramente. La referencia al sabor salado se recoge en un manuscrito alemán del siglo XV, la bendición de “Wilder Elbe” contra la enfermedad de niños encantados (Girón .R. M, Salcedo. A y Casanova. Á., 2005 )

Las primeras descripciones histopatológicas de la FQ se realizaron en el siglo XVI, concretamente en 1595, por Peter Paaw en Holanda. Éste realizó la autopsia a una niña de 11 años supuestamente hechizada que había padecido síntomas extraños durante ocho años de su vida; la paciente estaba muy delgada y su páncreas estaba abultado, cirroso, de color blanco y brillante; después de cortarlo y abrirlo determinó que la causa de muerte fue una enfermedad del páncreas. También Gerardus Blasius, en 1677, observó las mismas alteraciones en la autopsia de un niño de nueve años.

Un pediatra sueco, Nils Rosen von Rosenstein (1706-1773), detalló en su libro sobre las enfermedades infantiles, en el apartado de los procesos diarreicos, una enfermedad

denominada fluxus coeliasus, que consistía en diarrea, distrofia, falta de crecimiento, debilidad, edemas en manos y pies, vientre distendido y páncreas endurecido. Probablemente la descripción correspondía a la FQ.

En 1936, Fanconi estableció una relación entre la afectación pancreática y la respiratoria, publicando en una revista europea las características clínicas de una enfermedad que presentaron algunos de los miembros de una familia, denominándola “fibromatosis congénita familiar del páncreas con bronquiectasias”.

En 1938, Dorothy H. Andersen, patóloga de Nueva York, tras realizar estudios exhaustivos en los órganos obtenidos de autopsias, utilizó por primera vez el término de “fibrosis quística de páncreas”. Posteriormente, en 1944, Farber esgrimió el vocablo “mucoviscidosis” y afirmó que se trataba de una enfermedad generalizada que afectaba a las glándulas secretoras. Consecutivamente, Andersen y Hodges en 1954 concluyeron tras sus estudios, que la incidencia familiar era concordante con una herencia autosómica recesiva. En aquella época el diagnóstico se realizaba por la familiaridad y la afectación respiratoria y digestiva. (Girón .R. M, Salcedo. A y Casanova. Á,2005).

En 1952, Bodian elaboró la hipótesis acerca de la patogenia de la FQ explicando que secreciones anormalmente espesas taponarían los conductos excretores de las glándulas exocrinas produciendo fibrosis y destrucción del pulmón, páncreas, conductos deferentes e hígado. Fue el primer autor que describió las lesiones patognomónicas del hígado (cirrosis biliar focal). Ese mismo año, en Nueva York, una ola de calor originó que muchos pacientes con FQ sufrieran deshidrataciones con alcalosis hipoclorémica. Di Sant´Agnese, Perea y Ethel Shea comenzaron a investigar la causa de esta pérdida electrolítica. Realizaron un estudio en 43 enfermos con FQ y 50 sujetos sanos expuestos a una provocación térmica, observando que la cantidad de sudor en los enfermos con FQ era semejante al grupo control, aunque las concentraciones de cloro y sodio eran de 2 a 4 veces mayores. Los investigadores concluyeron que en la FQ existía una eliminación anormal de cloro y sodio por las glándulas sudoríparas. (Di Sant´Agnese PA, Darling RC, Perea GA, Shea E, 1953).

La determinación de cloro y sodio en el sudor comenzó a constituir el método diagnóstico de la FQ. Inicialmente se exponían a los pacientes a altas temperaturas para hacerlos sudar,

pero en 1959 Gibson y Cook diseñaron la prueba de estimulación del sudor mediante iontoforesis con pilocarpina, la cual permitía de forma segura analizar las concentraciones electrolíticas de cloro en el sudor.

Shwachman y col.(1963) describió que un 15 % de los enfermos no presentaban afectación pancreática, definió un sistema de puntuación clínica de gravedad, que lleva su nombre, vigente en la actualidad, y describió el método de conductividad, siendo ésta una técnica práctica y sencilla para realizar la prueba del sudor.

En 1983 Paul M Quinton, en la Universidad de California en Riverside, descubrió que en la capa epitelial de los conductos sudoríparos existía un defecto específico en la reabsorción de cloro, y por ello los pacientes con FQ mostraban un sudor con sabor salado. A su vez, en la Universidad de Carolina del Norte, Michael R Knowles y Richard C Boucher observaron en los tejidos epiteliales pulmonares una disminución de la secreción de cloro y un aumento de la absorción de sodio.

El esfuerzo de estas y otras investigaciones culminó con la localización del gen responsable de la FQ por un grupo de investigadores liderados por Lap-Chee Tsui y John R Riordan, del *Hospital for Sick Children*, en Toronto, y por Francis S Collins, en la Universidad de Michigan.( Collins F,et al.,1987 y Riordan JR, et al.,1989).

A la proteína codificada por este gen y relacionada con el gradiente del cloro la denominaron *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR).

También se identificó la anomalía genética más frecuente que afectaba al 70 % de los enfermos, conocida como F508 del, consistente en una delección de tres nucleótidos que originaba la alteración del aminoácido fenilalanina en la posición 508. Por técnicas de inmunohistoquímica se ha identificado el ARN mensajero de la CFTR en las glándulas sudoríparas, páncreas, criptas intestinales, conductos biliares y, en grandes cantidades en los túbulos renales, donde no se expresa la enfermedad, quizás debido a la existencia de un canal alternativo de cloro.

### 2.3 LA FIBROSIS QUÍSTICA

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva letal más frecuente en la raza caucásica; de evolución crónica, progresiva y compromiso multisistémico, presenta grandes variaciones fenotípicas según los diversos grupos étnicos estudiados . (Vega-Briceño L. E., Sánchez I., 2006).

La enfermedad se caracteriza por el espesamiento del mucus producido por las glándulas exocrinas induciendo compromiso sino-pulmonar con daño pulmonar progresivo, insuficiencia pancreática y por lo tanto síndrome de mala-absorción, con consecuente desnutrición, esterilidad masculina por atrofia de los conductos deferentes y elevación de electrolitos en el sudor.

En el Perú su prevalencia es desconocida; sin embargo, en los últimos años se vienen realizando trabajos de investigación relacionados con el diagnóstico de esta enfermedad.

En 1966, Tori describió tres casos de FQ, diagnosticados clínicamente y con pruebas de sudor no estandarizadas.

En 1994, Aguirre I y col. reportaron nueve casos de pacientes con diagnóstico altamente sugerente de FQ, la edad promedio de diagnóstico de la enfermedad fue entre los 10 meses a los 12 años. (Silva Acuña,C. 2008).

En 1998, Escalante R reporta 10 casos de FQ atendidos en el Instituto Especializado de Salud del Niño (IESN), datos recolectados entre 1991 a 1996.

En el 2001, Torres V. describe 13 casos con diagnóstico de FQ en pacientes de edades entre un mes hasta los 9 años con 8 meses y registrados desde 1991 hasta 2001. En este estudio se enfatiza que en los últimos años se ha incrementado el número de diagnósticos con FQ aproximadamente 13 % con relación al año anterior. Mutaciones más frecuentes en el gen CFTR de pacientes diagnosticados con fibrosis quística del Instituto Especializado de Salud del Niño fueron reportados por Silva Acuña en el 2008.

Hoy en día, en el Perú se siguen sumando los investigadores que aplicando últimas tecnologías como el PCR contribuyen a esclarecer y tener un panorama más claro de esta enfermedad, permitiendo que los individuos con FQ sean diagnosticados más



tempranamente y puedan ser sometidos a tratamientos terapéuticos avanzados, que les permitan lograr una esperanza de vida superior a los 30 años.

En Latinoamérica, se calcula que más del 95 % de casos de FQ no se diagnostican debido a la falta de sospecha clínica y de elementos adecuados para el diagnóstico. (Collazo T, et al.,2004).

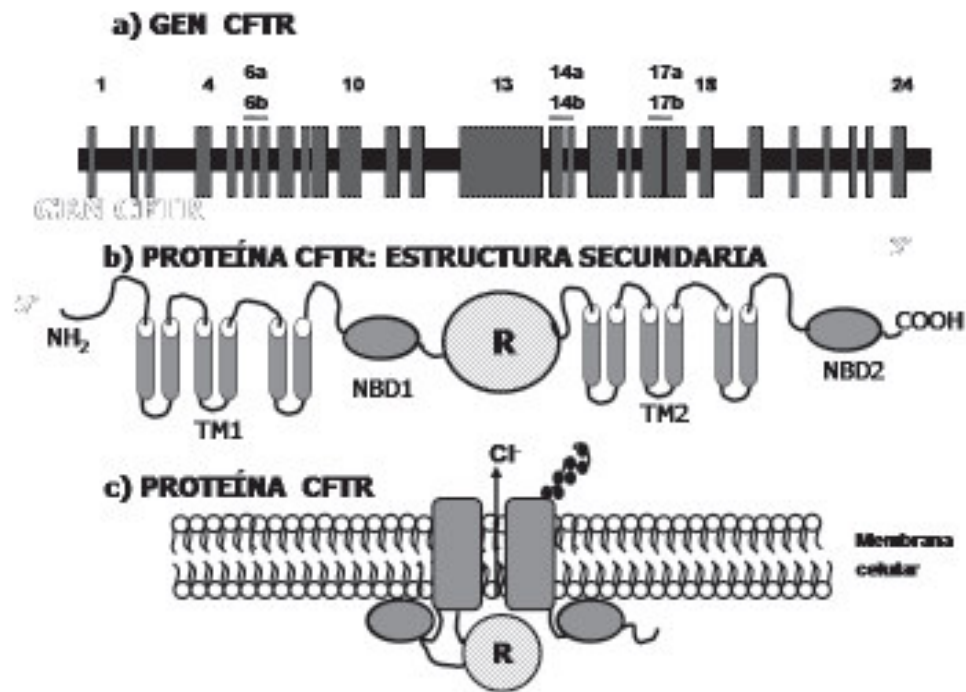
### **2.3.1. CFTR: gen y proteína**

#### **2.3.1.1. Formación y estructura de la *CFTR***

##### **EL GEN *CFTR***

En 1989, gracias a la disponibilidad de un gran número de familias con dos o más individuos afectados, se logró la clonación del gen responsable de la FQ (*CFTR/ABCC7*, OMIM #602421). Este gen se localizó mediante clonación posicional a partir de los marcadores D7S15, MET y D7S8, estrechamente ligados a *CFTR*. (Tsui L, et al., 1985 y Rommers JM, et al.,1989). Los primeros transcritos derivados de este gen se obtuvieron por combinación de mapeo físico e hibridación interespecie; con estos datos se dedujo la secuencia de su producto proteico. (Riordan JR, Alon N, Grzelczak Z, Dubel S, Sun S,1991).

Así, el gen *CFTR* se localiza en la banda q31 del cromosoma 7, contiene 250 kb, consta de 27 exones y se transcribe en un mRNA de 6.5 kb (Figura 2). ( Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z,1991).



**Figura 2.** Representación del gen y la proteína CFTR. La figura esquematiza:  
a) estructura del gen CFTR: los rectángulos verticales representan los 27 exones del gen;  
b) modelo propuesto de la proteína CFTR;  
c) ubicación de la proteína CFTR en la membrana celular

La identidad del gen se confirmó por la presencia de una delección de tres pares de bases en el exón 10 (mutación  $\Delta F508$ ) de los pacientes con FQ que no se observó en individuos normales. (Kerem BS, et al.,1989).

La región 5' de *CFTR* se caracteriza por un gran contenido de G-C (aproximadamente 65 %) y no presenta caja TATA, de tal manera que su promotor es similar al de los genes con expresión constitutiva; sin embargo, su expresión parece estar altamente regulada y confinada a ciertos tejidos. (Chou JL, Rozmahel R, Tsui LC,1991 y Yoshimura K,et al.,1991). Al parecer, los niveles de expresión del gen están modulados por cAMP, PKA, PKC y ésteres de forbol. Los patrones de expresión tejido específico de *CFTR* son similares en las diferentes especies de mamíferos, sugiriendo la presencia de elementos reguladores conservados evolutivamente, aunque se han reportado múltiples sitios de iniciación en el gen que parecen ser especie tejido-específicos (Orozco L,et al.,2006).

### ***CORTE Y EMPALME DEL TRANSCRITO CFTR***

En estudios recientes realizados tanto en tejidos de individuos normales como de individuos con FQ se ha logrado identificar, además del mensajero completo de *CFTR*, varias moléculas de mRNA que han perdido los exones 4, 9 o 12. El transcrito más común es aquel en el que se ha perdido el exón 9 (transcrito 9-) que, aunque genera un mRNA con marco de lectura abierto, no se traduce en una proteína funcional y parece no estar conservado entre las especies. (Zielenski J, Tsui LC, 1995). Este transcrito se encuentra en una proporción que varía de 10-92 %, dependiendo de la presencia de un polimorfismo que consiste en tres variantes alélicas de un tracto de politimidinas (5T, 7T y 9T) localizado en el brazo aceptor del sitio de corte y empalme del intrón 8; por ejemplo, los homocigotos 5T producen mayores niveles del mRNA sin el exón 9 (89-92 %) que los homocigotos 7T (50 %) y 9T (8-10 %). La eficiencia del corte y empalme del exón 9 parece ser tejido específica, ya que la proporción del transcrito 9- es mayor en células de los vasos deferentes, independientemente del número de timidinas. (Teng H, et al., 1997). Aunque el significado biológico de estos procesamiento alternativos aún no está claro, en algunas poblaciones se ha observado una asociación entre el alelo 5T y la ausencia bilateral de conductos deferentes (CBAVD), azoospermia obstructiva y bronquiectasias. (Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens, 1995).

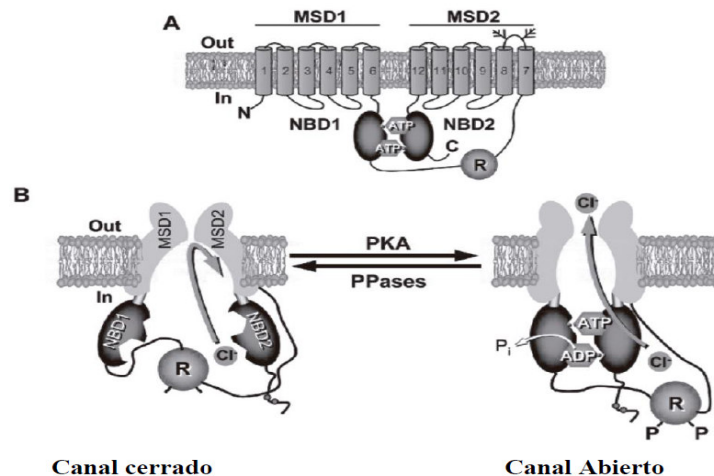
#### **2.3.1.2 Función de la CFTR**

El gen *CFTR* codifica para una glicoproteína transmembranal de 1,480 aminoácidos y 170 kDa.

Esta proteína funciona como un canal de cloro y por su papel fisiológico se denomina proteína reguladora de la conductancia transmembranal de la FQ o CFTR (“Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator”). (Orozco L, et al., 2006).

La estructura terciaria de la proteína está constituida por cinco dominios, 2 dominios transmembrana y 3 citosólicos (Figura 3). Los primeros son denominados dominios MSD (*membrane spanning domains*), cada uno constituido por seis hélices alfa, que posibilitan el paso de la proteína a través de la membrana celular. En el citosol se encuentran, dos dominios de unión a nucleótidos NBDs (*nucleotide binding domains*), lo que permite a la proteína utilizar energía en la forma de ATP. Finalmente, la activación de CFTR se produce por reacción de fosforilación en el dominio R (regulador), mediante una proteína quinasa

A (PQA). El carboxilo terminal de la proteína está unido al citoesqueleto por interacción con dominios proteicos. La regulación de CFTR depende principalmente de dos factores, la concentración de ATP intracelular y de un mecanismo de fosforilación. Previo a la apertura del canal, el dominio R está fosforilado en numerosos sitios de fosforilación mediante la proteína PQA dependiente de AMPc. Este evento posibilita la interacción del ATP con los NBDs que conduce a un cambio conformacional en los MSDs, permitiendo la apertura y cierre del canal. De esta forma la unión e hidrólisis del ATP a los NBDs llevará a una regulación fina del flujo de iones cloruro a través del canal. La actividad del canal finaliza cuando una fosfatasa desfosforila el dominio R y retorna CFTR a su estado de reposo. Por lo tanto la apertura y cierre del canal CFTR dependerá del balance de la actividad quinasa (PQA) y fosfatasa intracelular (PPasa). (Martina, P,2013).



**Fig.3** Modelo estructural simplificado del canal de cloro CFTR. El flujo del cloro a través del poro del canal está regulado por la fosforilación de una proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc y ciclos de ATP ligados a la hidrólisis en los NBDs. Abreviaciones: MSD, dominio transmembrana; PKA, proteína quinasa A; PPases, proteína fosfatasa; NBD, dominio de unión a nucleótido; P, fosforilación del dominio regulador R; P<sub>i</sub>, fosfato inorgánico; R, dominio regulador (tomado de Li H y colaboradores, 2007 (96)).

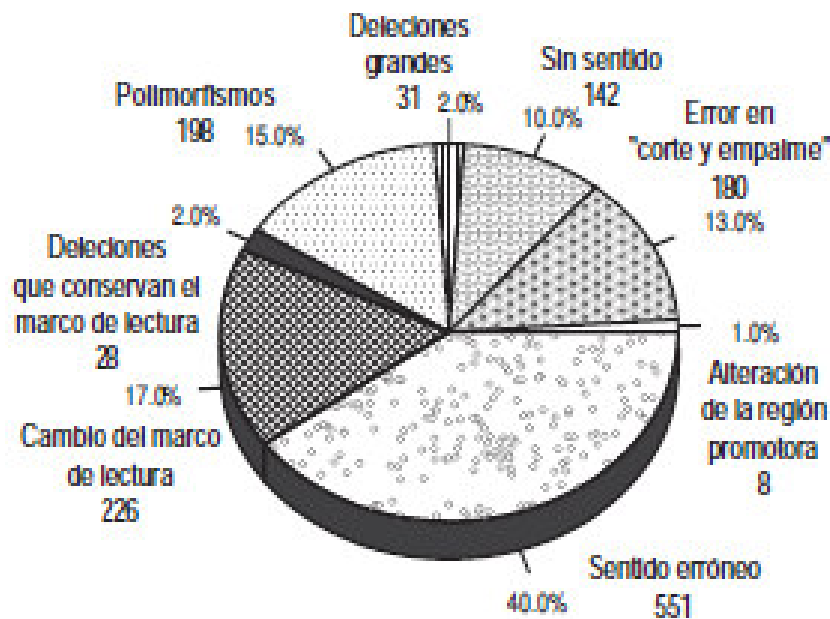
Se expresa en una gran variedad de tejidos especialmente pulmón, páncreas, glándulas sudoríparas, intestino, hígado, mucosa nasal, glándulas salivales y tracto reproductivo. (Orozco L., et al., 2006).

Existen evidencias experimentales que demuestran que la CFTR, además de ser un canal de cloro dependiente de cAMP, puede tener otras funciones, por ejemplo el transporte de bicarbonato y la regulación de otros canales endógenos de cloro y calcio. (Choy JY, et al., 2001).

### 2.3.2. Mutaciones de la FQ

#### MUTACIONES EN EL GEN *CFTR*

A la fecha, el Consorcio Internacional de Fibrosis Quística ha reportado más de 1,300 mutaciones diferentes y alrededor de 200 polimorfismos en el gen *CFTR* (Figura 4).

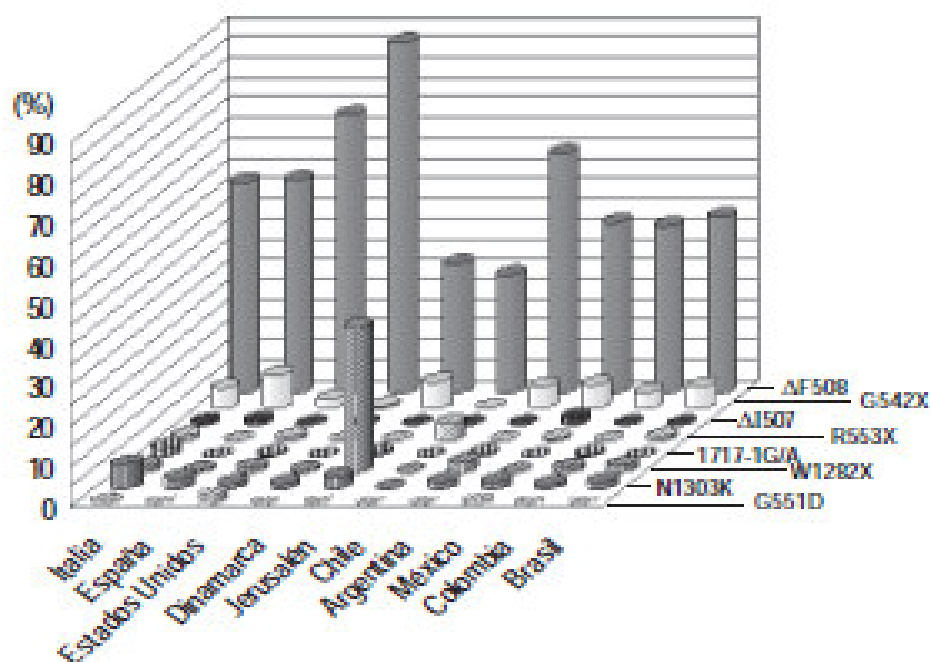


**Fig.4** Mutaciones que afectan el gen *CFTR*. La gráfica muestra los diferentes tipos de mutaciones encontradas en el gen *CFTR*. El número está documentado en la base de datos reportada por el Consorcio Internacional de Fibrosis Quística.<sup>29</sup>

Su distribución en el gen no parece ser al azar, ya que se ha detectado una alta frecuencia de mutaciones en ciertos exones como el 4, 7, 11, 17b y 20.(Roldán A.M ,2013).

Adicionalmente, ciertas mutaciones puntuales en realidad son polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) que potencialmente podrían afectar la expresión de *CFTR*. Algunos de ellos interfieren con las señales de corte y empalme, mientras que otros ocurren en regiones codificadoras del gen; de estos últimos, alrededor de 50 % dan lugar a sustituciones de aminoácidos (Rowntree R, Harris A,2002).

Se ha observado una gran heterogeneidad en el espectro de las mutaciones del gen *CFTR*, particularmente en el Sur de Europa y América Latina (Figura 5).



**Fig.5** Distribución en diferentes poblaciones de las mutaciones FQ. Se representa la frecuencia de las ocho mutaciones más frecuentes en el gen CFTR y su distribución en diversas poblaciones. Nótese la alta frecuencia de la mutación  $\Delta F508$  en todas ellas y de la  $W1282X$  en población judía.

Al parecer este fenómeno está relacionado con la composición étnica de cada región, por ejemplo, la distribución de la mutación más común, la  $\Delta F508$ , varía de un máximo del 100 % en las Islas Faroe de Dinamarca hasta 24.5 % en Turquía. (Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM, 2002). En Europa, la frecuencia de esta mutación se presenta con un claro gradiente de Noroeste a Sureste. Existen evidencias que sugieren que, la mutación  $\Delta F508$  fue introducida al Continente Americano por las migraciones provenientes de Europa, ya que la mutación se ha encontrado asociada al mismo haplotipo que en las poblaciones europeas (Orozco L, et al., 2001). y no se ha detectado en los grupos amerindios estudiados. (Grebe TA, et al., 1992). Así, en Estados Unidos y Canadá esta mutación tiene una frecuencia muy elevada (68.6 y 71.4 %, respectivamente), similar a la reportada en poblaciones del norte de Europa, mientras que en la población latinoamericana la frecuencia de la mutación es más baja, aunque es de notarse que varía entre los diferentes países (Argentina 58.6 %, Brasil 47 %, México 40.7 %, Colombia 35.4 %, Venezuela 29.6 %, Chile 29.2 % y Ecuador 25 %) (Bobadilla JL, et al., 2002). Es posible que aunque estas

poblaciones están formadas por nativos, blancos, negros y las mezclas de las diferentes razas, estas variaciones se deban a que existen diferencias significativas en las proporciones de los subgrupos de cada país.(Arzimanoglou II, et al.,1995).

Más aún, estudios realizados en diferentes regiones de México mostraron una frecuencia variable de la mutación  $\Delta F508$  (50 % en la región Norte, 34.4 % en el Occidente y 40.7 % en la región Centro) (Orozco L, et al.,2000). Resulta interesante el hecho de que la frecuencia observada en la región Norte es similar a la reportada en España (52,7%), Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. (Bobadilla JL, et al.,2002), mientras en el Occidente y Centro, donde 50 % de los genes son de origen amerindio, 40 % caucásico-hispano y el resto africano. (Lisker R, Ramirez E, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V, 1990), ésta es más baja. Estas observaciones hacen suponer que, durante la época de la Colonia la frecuencia de esta mutación se haya diluido por la mezcla entre poblaciones españolas y amerindias en las regiones Occidente y Centro, mientras que en el Norte esta mezcla ocurrió en menor proporción debido a que las poblaciones nativas mostraron mayor resistencia y llevaban una vida nómada.

Las otras mutaciones en *CFTR* son poco comunes y aunque algunas son frecuentes en ciertas poblaciones, la mayoría se presenta en menos de 1 % de los cromosomas FQ. Inclusive, la segunda mutación más común (G542X), se detecta sólo en 2.4 % de los alelos *CFTR* afectados en todo el mundo, aun cuando en México, Colombia, España y las Islas Canarias se ha detectado en una proporción más alta (6.1, 6.3, 8 y 25 %, respectivamente). (Restrepo MC, et al., 2000).

En poblaciones como la caucásica, donde la mutación  $\Delta F508$  es sumamente frecuente, la búsqueda de cinco mutaciones en el gen *CFTR* ( $\Delta F508$ , G542X, N1303K, R553X y G551D) logra la detección del 85- 90 % de los alelos FQ.

## **ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS Y MUTACIONES RECURRENTES**

Estudios extensos para la identificación de marcadores moleculares dentro y fuera del gen *CFTR* han revelado que ciertas mutaciones como la  $\Delta F508$ , G542X y N1303K se encuentran asociadas con haplotipos únicos, lo que sugiere que cada una de ellas se derivó



de un mismo evento mutacional (Morral N, Dotk T, Dziadek V, Llevadot R, Feree C, 1994). Con base en el análisis de haplotipos se ha sugerido que la mutación  $\Delta F508$  se originó en Europa hace aproximadamente 52,000 años, mientras que la G542X fue introducida a España por los fenicios hace 2,500-3,000 años (Niu T, Quin ZS, Xu X, Liu JS, 2002). Otras mutaciones como la R117H, H199Y, R334W, R347P, R553X, L558S, 3272-26A $\rightarrow$ G, 3849+10kbC y TR1162X, se encuentran asociadas a más de un haplotipo, por lo que probablemente representen mutaciones recurrentes que surgieron de manera independiente (Morral N, et al., 1994).

Los cromosomas con la mutación  $\Delta F508$  se encontraron asociados con el haplotipo B en 97.2 %, como se ha reportado en otros países de América del Norte y Europa; sin embargo, la G542X se encontró asociada con este haplotipo sólo en 72.7 % de los cromosomas, el resto se asoció con los haplotipos A y D (Cuadro 1). Este hallazgo contrasta con lo reportado en otras poblaciones, donde esta mutación se ha encontrado asociada casi exclusivamente con el haplotipo B. Las mutaciones poco frecuentes y las desconocidas, así como los alelos normales, se asociaron con mayor frecuencia a los haplotipos A y C (Orozco L, et al., 2001). Esta heterogeneidad encontrada en pacientes mexicanos puede ser explicada por:

- Eventos de recombinación
- Mezcla entre poblaciones con distribución de haplotipos diferente.
- La presencia de mutaciones FQ en la población de nativos americanos.

**Cuadro 1.** Frecuencia de haplotipos y de mutaciones en el gen CFTR en pacientes mexicanos con fibrosis quística.

Mutación	No. de alelos afectados	Frecuencia %	Haplotipos* (%)			
			A	B	C	D
$\Delta F508$	79	40.72		97.2		2.3
G542X	12	6.18	9.09	72.72		18.18
$\Delta I507$	5	2.54				100.0
S549N	5	2.54	100.0			
N1303K	4	2.06		100.0		
R75X	3	1.54			100.0	
406-IG $\rightarrow$ A	3	1.54				100.0
I148T	3	1.54		100.0		
2055del19	2	1.03	100.0			
935delA	2	1.03			100.0	
I506T	2	1.03			100.0	
2183AA $\rightarrow$ G	2	1.03				100.0
Otras mutaciones	23	11.8	40.6	15.6	28.1	15.6
Total 34	145	74.51				

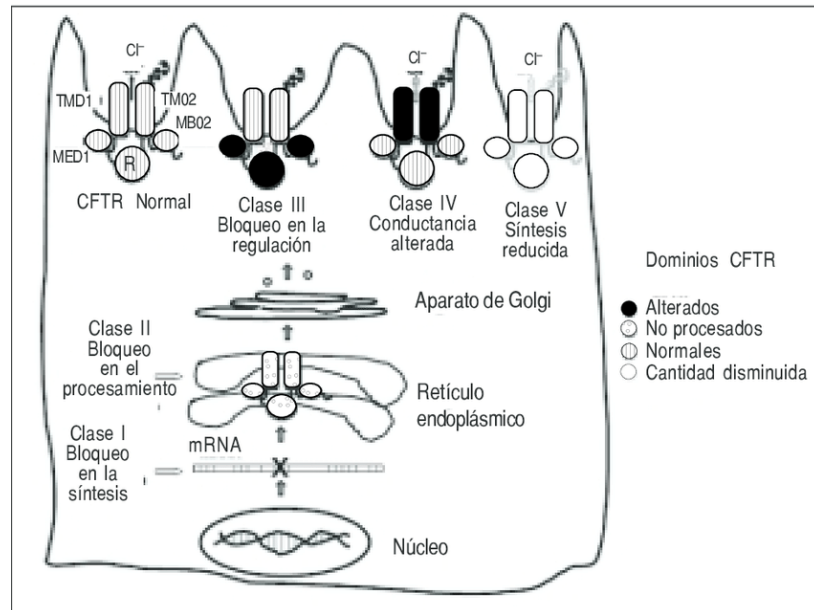
\* Derivados de los polimorfismos tipo RFLPs XV-2C y KM-19.



### 2.3.2.1 CLASIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES DE LA CFTR

#### BASES MOLECULARES DE LA DISFUNCIÓN DEL CANAL CFTR

Con la finalidad de entender más acerca de la fisiopatología de la FQ, las mutaciones se han clasificado en seis clases de acuerdo con la alteración que se genera en la proteína (Figura 6). (Fielbaum, O, 2011).



**Fig.6** Consecuencias moleculares de las mutaciones. Se muestran las diferentes clases de mutaciones y sus implicaciones en la función de la proteína CFTR.

#### I. Según el mecanismo molecular alterado

##### Clase I: Mutaciones que bloquean la síntesis de la proteína

Cerca de la mitad de las mutaciones en el gen *CFTR* que pertenecen a este grupo conducen a la formación de proteínas truncadas y no funcionales.

Entre ellas se encuentran aquellas que generan codones de terminación (18 %), corrimiento del marco de lectura (22 %) y las que afectan el proceso de corte y empalme del RNA (8 %). Las dos primeras generalmente causan ausencia total de la proteína (Zielenski, 1995).

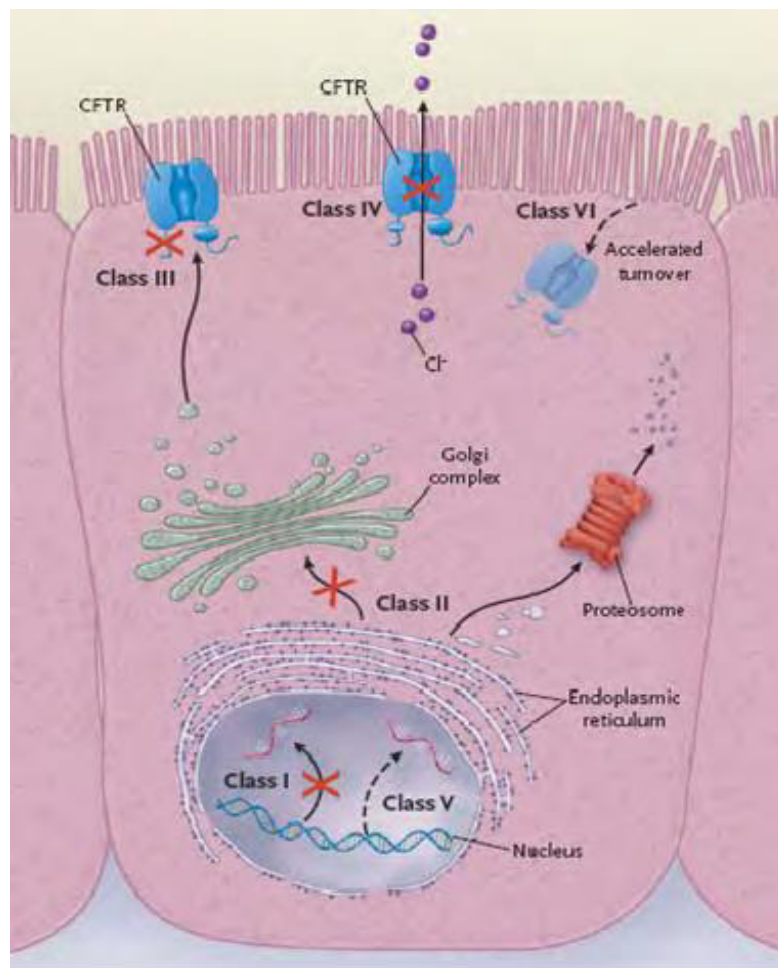
##### Clase II: Mutaciones que afectan el procesamiento postraduccional

La biosíntesis de la proteína CFTR requiere pasos de maduración complejos, por lo que algunas mutaciones, como la  $\Delta F508$ , afectan este proceso y generan péptidos anormales

que quedan atrapados en el retículo endoplásmico (RE), donde son degradados por el sistema ubiquitina-proteosoma (vida media de 0.5 h) (Amaral, 2004).

### Clase III: Mutaciones que afectan la regulación del canal de cloro

Las mutaciones clasificadas en esta categoría son aquellas que generan proteínas que parecen estar correctamente localizadas en la membrana apical, pero que no funcionan adecuadamente como un canal iónico. Algunas de estas mutaciones afectan los dominios NBDs y el dominio R (Figura 4). (Hiestad, 1994). El grado de alteración puede variar desde una leve reducción de la actividad del canal (mutaciones G551S, G1244E y G1349D) hasta la pérdida grave de su función (mutaciones G551D y S1255P). (Carson, 1995).



**Figura N° 7. Clases de Mutaciones en el gen *cftr***

Clase de defectos en el gen *cftr* incluye la ausencia de síntesis (**clase I**); defecto de la maduración de la proteína y degradación prematura (**clase II**); desorden en la regulación, como la disminución de la unión a ATP e Hidrólisis (**clase III**); defecto en la conductancia del cloro (clase IV); reducida síntesis de CFTR (**clase V**); y una acelerada expulsión de la proteína de la superficie celular (**clase VI**) 18. Tomado de Ratjen F, Doring G. *Cystic fibrosis. Lancet* 2003; 361:681-9

#### **Clase IV: Mutaciones que afectan la conductancia del canal de cloro**

Estas mutaciones se localizan en regiones del gen que codifican para algunos de los segmentos TMs de la proteína (Mansoura, 1998); por ejemplo la R117H en la región TM2, la G314E y G314Q en TM5 y la R334W, R347P y R347H en TM6. En estos casos aunque la regulación del canal es adecuada, su conductancia es anormal.

Estudios recientes mostraron que algunas mutaciones del dominio R también pertenecen a este grupo (Vankeerberghen, 1998).

#### **Clase V: Mutaciones que causan reducción en la síntesis de la proteína**

Las mutaciones de esta clase incluyen aquellas localizadas en el promotor, las cuales reducen la transcripción y las mutaciones puntuales que conducen a un procesamiento erróneo del mRNA o a sustituciones de aminoácidos como la P574H y la A455E.

Las proteínas mutadas tienen una actividad normal tanto en regulación como en conductancia; sin embargo, su procesamiento postraduccional es ineficiente (Zielenski, 1995).

#### **Clase VI: Defecto en la regulación de otros canales.**

En esta clase se agrupan mutaciones que afectan las propiedades reguladoras del CFTR sobre otros canales de iones como el ORCC o el ENAC . (Casals T,1997)

### ***II. Según las manifestaciones clínicas***

**1) Mutaciones severas:** no hay proteína funcional,  $[Cl^-]>80\text{meq/L}$  en el sudor, IP (95 %), problemas hepáticos (3-5 %), diagnóstico temprano (<1 año), MI (20 %), problemas respiratorios graves (clase I, II y III).

**2) Mutaciones suaves:** se producen pequeñas cantidades de proteína,  $[Cl^-]<80\text{meq/L}$  en el sudor, IP (85 %), diagnóstico tardío (>10 años), no MI, problemas respiratorios más suaves (clase IV).

### 2.3.2.2. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Existe una clara variabilidad en la presencia o gravedad de cada una de las manifestaciones clínicas de la FQ y parece ser que esto, en parte, es la consecuencia de la gran variación de las mutaciones en el gen (Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin TL, Cutting GR, 2002). El análisis de la funcionalidad de algunas mutaciones expresadas en ovocitos de *Xenopus*, reveló que la corriente de cloro generada se encuentra reducida en el siguiente orden: silvestre > mutante con función residual > mutante no funcional (Sheppard ND, Ostedgaard SL, 1996), lo cual sugiere que existe correlación entre el genotipo y la función del canal de cloro. Diversos estudios han tratado de encontrar las características clínicas que comparten los pacientes con FQ que portan un mismo genotipo (correlación fenotipo-genotipo) y han logrado clasificar a las mutaciones en graves (clase I, II o III) y leves (clases IV o V), donde las primeras ocupan aproximadamente 92 % de todas las mutaciones (Doull I, 2001). De todos los síntomas analizados, sólo la función pancreática correlaciona directamente con el genotipo de los pacientes. En general, los pacientes con IP son homocigotos o heterocigotos compuestos para dos mutaciones graves, mientras que los pacientes con SP son homocigotos o heterocigotos compuestos con al menos una mutación con función residual. Como en todas las enfermedades recesivas, las mutaciones leves son dominantes sobre las graves. (Durno C, et al., 2002)

### OTROS FENOTIPOS

Una característica clínica frecuente en los pacientes masculinos con FQ es la azoospermia obstructiva y la ausencia bilateral congénita de conductos deferentes (CBAVD). De hecho, la CBAVD aislada puede heredarse como una condición autosómica recesiva, donde se han documentado mutaciones en *CFTR* en uno o ambos alelos (60-70 % y 10 % de los casos, respectivamente) (Rowntree RK and Harris A, 2003). Algunos estudios han mostrado que pacientes con el mismo genotipo presentan CBAVD, mientras que otros no, lo que sugiere que otros factores e inclusive otros genes pueden estar involucrados en el desarrollo de esta patología (Rave-Harel N, et al., 1995).

Los pacientes con CBAVD en los que no se han detectado mutaciones en *CFTR* aparentemente tienen una etiología diferente (Jarzabet K, et al., 2004).

Otras patologías donde se han encontrado mutaciones en *CFTR* son: la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasias difusas, aspergilosis broncopulmonar alérgica, bronquitis crónica por *Pseudomona aeruginosa*, asma, sinusitis crónica, pólipos nasales, pancreatitis obstructiva crónica, hipertripsinemia neonatal transitoria, azospermia obstructiva idiopática, etc. (Ninis VN, et al., 2003). Así, las mutaciones en *CFTR* dan como consecuencia manifestaciones clínicas muy variadas, que pueden ir desde esterilidad primaria como única manifestación clínica hasta el cuadro clásico de FQ, que puede conducir al paciente a la muerte durante los primeros meses de vida.

### **2.3.3. Fisiopatología de la Fibrosis Quística.**

El mecanismo de acción en condiciones normales, de la proteína CFTR, es permitir el flujo de iones a través de los epitelios desde el interior de la célula hacia el espacio luminal. La salida del anión cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), provoca el arrastre del catión sodio ( $\text{Na}^+$ ) y como consecuencia, sale agua al espacio extracelular (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology [Internet]. France: Jean-Loup Huret. University Hospital of Poitiers; 2012)

En definitiva, la FQ es una patología producida por una mutación en el gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana (CFTR), localizada en la parte superior de las células epiteliales. Esta proteína interviene en el paso del ion cloro a través de las membranas celulares y su deficiencia altera la producción de sudor, jugos gástricos y moco. La enfermedad se desarrolla cuando los dos genes FQ del paciente presentan alteraciones genéticas que hacen que la proteína, bien no exista o tenga alterado su funcionamiento.

La alteración del transporte de electrolitos, particularmente del transporte de  $\text{Cl}^-$ , es la anomalía principal en la fibrosis quística. Las secreciones en diversos órganos son, en las fibrosis quísticas, anormalmente espesas y deshidratadas lo que provoca la obstrucción de los conductos del páncreas, glándulas salivares, epidídimo, intestino, bronquios, y bronquiolos. La formación de estas secreciones anormalmente espesas es el resultado final de un flujo alterado de iones cloruro e iones sodio y del agua que les acompaña. Actualmente se acepta que son las secreciones espesas las que dan cuenta de la insuficiencia pancreática que presenta el 85% de los pacientes, de la infertilidad del 90%

de los varones enfermos y de las obstrucciones de los bronquios y las infecciones respiratorias (Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL. 1995).

No se descarta, sin embargo, la posible influencia de otros factores que ayuden a modular la fisiopatología de la enfermedad y que condicionen el pronóstico. (Molano J & Barreiro T, 2012).

Para que exista una afectación orgánica en la FQ se deben dar una combinación de al menos tres factores: el genotipo (tipo de mutación del gen CFTR), la alteración de la secreción epitelial mediada por el canal del cloro (que se asocia a la proteína CFTR) y las características anatómicas y fisiológicas específicas de los órganos afectados. (Perez-Aguilar F, Berenguer J, 1998).

**Pulmón.** Diferentes estudios evidencian que los pulmones son histológicamente normales en el momento del nacimiento. ES probable que la lesión pulmonar comience tras la obstrucción difusa de las vías respiratorias de pequeño calibre por secreciones mucosas demasiado espesas. Las secreciones de moco denso provocan una limpieza deficiente de las vías respiratorias que da lugar a un hábitat ideal para la colonización bacteriana y la infección pulmonar posterior. La obstrucción y la infección conllevan el desarrollo posterior de bronquiolitis y tapones mucopurulentos en las vías aéreas. Actualmente, se concede mayor importancia al papel que ocupa la inflamación por sí misma en el proceso de lesión pulmonar (incluso en ausencia de infección) y que, además, progresa durante toda la vida. Cuando el proceso pulmonar avanza, las paredes bronquiales se hacen más gruesas, la vía respiratoria se satura de secreciones viscosas y purulentas, se desarrollan áreas de atelectasia y aparecen adenopatías hiliares. La Hipoxemia crónica induce la hipertrofia muscular de las arterias pulmonares, lo que ocasiona hipertensión pulmonar e hipertrofia cardíaca derecha. (Mall M, Boucher RC, 2006).

Cuando se producen infecciones en las primeras etapas de la enfermedad, el patógeno que se aísla con mayor frecuencia en la vía respiratoria es el *Staphylococcus aureus*, pero a medida que la FQ progresa, aumenta la proporción de cultivos positivos para *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (más del 90%). Existe una variante mucoide de *Pseudomonas* que muestra una asociación especial con la FQ. El 7% de los pacientes adultos están colonizados por *Burkholderia cepacia*, lo que se asocia a un rápido deterioro pulmonar. También pueden estar implicados otros gérmenes, tales como *Haemophilus influenzae*, micobacterias atípicas, hongos, etc. (Conway S, Denton M, 2006).

## Aparato Digestivo

El CFTR se localiza en la superficie apical de las células de las vellosidades intestinales y de las criptas, las mutaciones en el gen CFTR determinan una alteración en la secreción de cloruro y bicarbonato por las células epiteliales y, en consecuencia, una disminución del contenido de fluidos en el lumen intestinal. (Ver tabla 1)

<b>Sistémicas</b> Fallo de crecimiento Malnutrición / kwashiorkor Deficiencias de micronutrientes
<b>Esófago</b> Reflujo gastroesofágico Esofagitis Várices esofágicas
<b>Páncreas</b> Insuficiencia pancreática Pancreatitis
<b>Hepatobiliares</b> Extrahepáticas Microvesículas Dilatación vesicular Colelitiasis Estenosis del conducto biliar común Colangiocarcinoma Colangitis esclerosante  Intrahepáticas Colestasis neonatal Esteatosis Cirrosis biliar focal Cirrosis multilobular
<b>Intestino</b> Íleo meconial Síndrome de obstrucción intestinal distal Constipación Prolapso rectal Colonopatía fibrosante

Tabla .1 Fisiopatología intestinal

La insuficiencia pancreática exocrina está presente en alrededor del 90% de los pacientes con fibrosis quística .(Ratjen F, Döring G ,2003). La enfermedad del páncreas se cree que resulta de la reducción del volumen de la secreción pancreática con bajas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$ . (Kopelman H, et al. 1985).

Sin suficiente líquido y sin  $\text{HCO}_3^-$  que neutralice el contenido gástrico ácido que entra al intestino delgado, las proenzimas digestivas son retenidas en los conductos pancreáticos y se activan prematuramente, en última instancia esto conduce a la destrucción tisular y la fibrosis. La malabsorción aguda o crónica resultante contribuye al incumplimiento de los

requerimientos energéticos, causado por el estado hipermetabólico asociado con la infección endobronquial. (Cheng SH, et al.,1990).

Estos factores pueden exacerbar la infección en los pulmones, dando lugar a un círculo vicioso de malnutrición e infección. El estado nutricional es un fuerte determinante en el pronóstico y la sobrevida. (Shepherd R, et al., 1999).

El íleo meconial es la manifestación más temprana de la fibrosis quística, ocurre en el 15-20% de los pacientes portadores de dos mutaciones severas. (Shepherd R,et al.,1999).

El CFTR se expresa en las células de las vías biliares, y por lo menos un tercio de los pacientes tienen resultados anormales de las pruebas de función hepática. En un 30% de los pacientes con fibrosis quística, la vesícula biliar, presenta disminución de tamaño y funcionamiento. Los cálculos biliares están presentes en un 10% de los pacientes FQ. (Lai H,et al.,2000).

En los pacientes FQ que presentan enfermedad hepática, se aumenta la malabsorción de vitaminas liposolubles por la deficiencia de sales biliares.

### **Glándulas sudoríparas.**

Los pacientes con FQ secretan una cantidad casi normal de sudor hacia el acino glandular, pero las células epiteliales ductales son incapaces de absorber el NaCl del sudor a su paso por el conducto glandular. (Paz L, 2013).

### **Otras manifestaciones**

#### **Aparato reproductor**

El 98% de los hombres con fibrosis quística son infértiles, con azoospermia obstructiva o ausencia de conductos deferentes y dilatación o ausencia de las vesículas seminales. (Dodge JA. 1995). Aún las variantes más benignas de la fibrosis quística se asocian con ausencia del conducto deferente y la consiguiente esterilidad se atribuye a una secreción anormal del conducto de Wolf que determina su oclusión. (Solari A,2004).

La función sexual y la espermatogénesis son normales. La función reproductiva femenina es normal, aunque el moco cervical puede estar deshidratado, lo que podría ocasionar infertilidad.



## Diabetes

En la fibrosis quística son frecuentes las anomalías del metabolismo glucídico, que van desde una leve intolerancia a la glucosa, con hiperglucemia posprandial variable, o una hiperglucemia transitoria en ayunas, hasta diabetes crónica con hiperglucemia en ayunas. (Moran A, et al., 1991).

La diabetes en pacientes con fibrosis quística comparte características de los desórdenes tipo 1 y 2 y, en la mayoría de los pacientes, existe una combinación de reducción y retraso de la secreción de insulina con insulino resistencia. (Holl RW, Wolf A, et al., 1997).

## Enfermedad ósea

Los pacientes fibroquísticos presentan mineralización ósea anormal. (Bhudhikanok GS, et al 1996). La masa mineral ósea en los pacientes FQ se ve disminuida por deficiencia de nutrientes específicos como la vitamina K, magnesio, zinc y otros que debido a sus características liposolubles no son absorbidos como sucede con la vitamina D y el calcio.

La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica, caracterizada por una masa ósea disminuida y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que determina una mayor fragilidad ósea y riesgo de fracturas. La consecuencia más crítica de la osteoporosis es la fractura no traumática de las vértebras, que puede afectar a la función pulmonar, alterar la mecánica respiratoria y la talla del paciente. (Echeverría I, 2011).

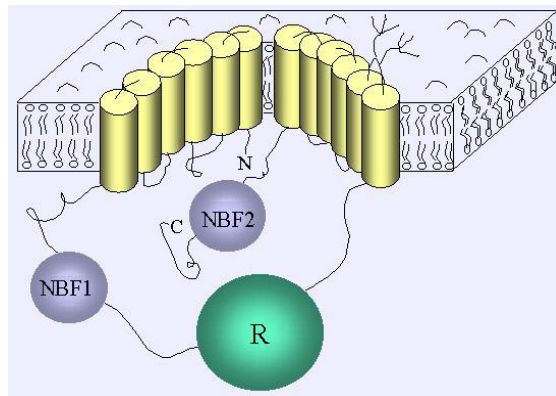
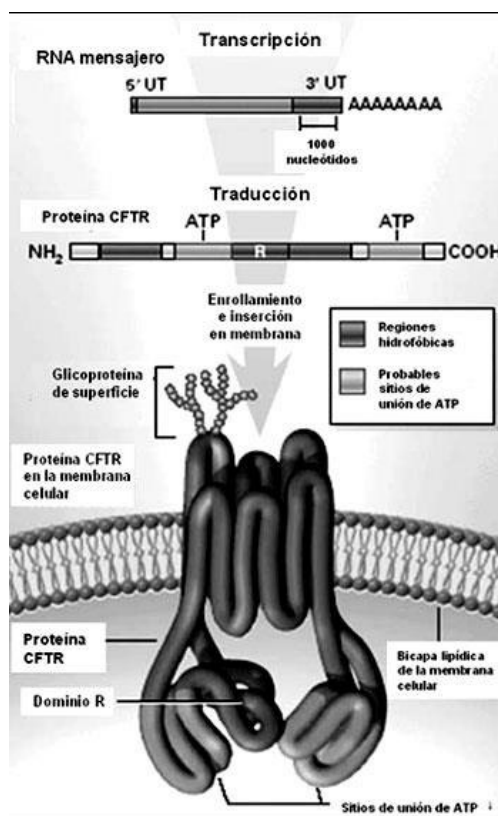


Fig. 8 Estructura propuesta para la proteína CFTR, por Riordan y cols., 1989 - Pascale Fanen



**Fig. 9 Representación de la proteína CFTR en la membrana celular**

### 2.3.4 Manifestaciones Clínicas

La FQ se caracteriza por problemas progresivos en el sistema respiratorio y en el tracto digestivo, incluyendo enfermedades del hígado y diabetes mellitus. Está asociada además a problemas de fertilidad en ambos sexos, especialmente en varones. Las manifestaciones clínicas generales se presentan en los primeros años de vida, aunque pueden existir formas leves de diagnóstico tardío (Murray J, Cuckle H, Taylor G, Littlewood J, Hewison J, 1999). En la tabla 6 se resumen las manifestaciones clínicas más frecuentes de la FQ.

#### Aparato respiratorio

Más del 50% de los pacientes presenta clínica respiratoria, con alteraciones de la función pulmonar de diferente intensidad, pudiendo verse afectados todos los niveles de las vías respiratorias. Los síntomas más frecuentes son tos y respiración sibilante crónicas asociadas a infecciones pulmonares crónicas o recidivantes.

Las manifestaciones clínicas más comunes son los episodios de obstrucción bronquial que se inician precozmente en la vida infantil. El síntoma más frecuente es la tos, que suele ir acompañada de expectoración, náuseas, vómitos y trastornos del sueño. La afectación

aguda y crónica del parénquima pulmonar produce fibrosis extensa y cambios en la mecánica del pulmón y de las vías respiratorias. Las lesiones pulmonares evolucionan hacia la insuficiencia respiratoria y hacia el “cor pulmonale”, que constituyen las causas de muerte más frecuentes en los pacientes con FQ (Boat TF,2004). También puede producirse afectación de la vías aéreas superiores como sinusitis crónica o recidivante, así como poliposis nasal (Cabrera G, Fernández-Burriel T, Cabrera P,2003). En general, más del 95% de los pacientes fallece por complicaciones como resultado de una infección pulmonar.

### **Aparato gastrointestinal**

La enfermedad gastrointestinal grave suele ser la característica patológica inicial en la fibrosis quística.

Íleo meconial: es una obstrucción intestinal debida a la presencia de meconio muy denso que se adhiere a la mucosa del íleon terminal. El íleo meconial es casi siempre una manifestación precoz de la FQ y se adhiere a la mucosa intestinal y causa la obstrucción del íleon terminal. Distal a la obstrucción, el colon es estrecho y contiene meconio seco. Este colon relativamente vacío y de pequeño diámetro recibe el nombre de “microcolon”. La FQ puede asociarse también a un retraso de la expulsión neonatal de meconio o a un síndrome del tapón meconial (forma transitoria de obstrucción intestinal distal secundaria a la presencia en el ano o en el colon de uno o varios tapones de meconio espeso) (Murray J, et al., 1999). A nivel esofágico, se puede producir reflujo más frecuente en los pacientes con FQ mayores de cinco años, esofagitis péptica o varices esofágicas

La intususcepción, penetración de un segmento del tubo digestivo en otro, generalmente situado por debajo. Puede causar obstrucción y estrangulación del intestino. La mayoría se inician de forma aguda con dolor abdominal intermitente, intenso, aunque algunos pacientes aquejan síntomas leves durante meses antes de ser diagnosticados.

La insuficiencia pancreática produce mala absorción de grasa y proteínas. Se suele manifestar en las primeras etapas de la vida y puede ser progresiva. La esteatorrea (presencia de una cantidad excesiva de grasas en las heces) es la más importante manifestación clínica, y afecta al estado nutritivo, al desarrollo y a la absorción de micronutrientes y vitaminas liposolubles. Se manifiesta como deposiciones frecuentes de heces voluminosas, malolientes y de aspecto oleoso. Los pacientes con frecuencia aquejan meteorismo. Sólo un 15% de los adolescentes y los adultos (excepcionalmente en niños)

pueden presentar episodios de pancreatitis aguda. En los pacientes con insuficiencia pancreática manifiesta, sólo algún caso aislado ha cursado con pancreatitis aguda, debido a la escasa producción de enzimas. El 80% de las pancreatitis crónicas en la FQ cursan sin calcificaciones (Pérez-Aguilar F, Berenguer J, 1998).

La afectación hepatobiliar es frecuente en los pacientes adultos y, en estos, es la segunda causa más común de mortalidad, después de la enfermedad pulmonar. Pueden existir colestasis crónica, inflamación, fibrosis e incluso cirrosis. En los adolescentes y adultos se puede encontrar una cirrosis biliar multilobular con varices e hipertensión portal. Además, son frecuentes los trastornos de las vías biliares extrahepáticas. (Westaby M, 2006). Los pacientes con FQ pueden tener colelitiasis, con frecuencia en vesículas pequeñas (microvesículas) (Pérez-Aguilar F, Berenguer J, 1998).

Los pacientes adultos desarrollan una diabetes mellitus insulino dependiente, por destrucción de las células que producen la insulina en el páncreas. Se pueden detectar alteraciones subclínicas del metabolismo de la glucosa en un número de personas considerablemente elevado (Boucher RC, 2008).

**Malnutrición.** La nutrición es un aspecto fundamental a vigilar en los pacientes con FQ, especialmente en niños, y se ha constatado una asociación entre deterioro de la función pulmonar, supervivencia y estado general. Entre los factores que pueden contribuir a la malnutrición están (Welsh MJ, 2004):

- el grado de esteatorrea y de creatorrea en función de la gravedad de la insuficiencia pancreática;
- la gravedad de la enfermedad respiratoria;
- la cantidad y calidad de macronutrientes ingeridos;
- la deficiencia de micronutrientes;
- la pérdida de ácidos biliares asociada a la esteatorrea;
- la hepatopatía y la diabetes mellitus.

En función del grado de la enfermedad, los niños pueden presentar un desarrollo insuficiente, con retraso en la ganancia de peso y estatura. En los lactantes que no sufren íleo meconial, la FQ suele comenzar por un retraso en la recuperación del peso al nacimiento y por una ganancia de peso insuficiente hacia la 4ª-6ª semanas de edad (Boat TF, 2004).

### **Afectación del aparato genitourinario**

Los varones con FQ suelen ser estériles debido a la ausencia congénita bilateral de los conductos deferentes (ACBVD) o a su atrofia (Murray J, et al., 1999), lo que produce azoospermia (falta de producción de espermatozoides) y disminución del volumen eyaculado. La ACBVD se manifiesta cuando la actividad residual de la proteína CFTR es menor del 10%. Parece que el aparato reproductor masculino es el más sensible a los defectos de la función de la proteína CFTR. Los pacientes con ACBVD pueden ser diagnosticados como enfermos de FQ con esa única manifestación fenotípica. La maduración sexual también es más tardía (en promedio dos años más tarde) que en niños sanos (Cabrera Roca G, et al., 2003)

En las mujeres la presencia de un moco espeso en el tracto genital puede afectar a la fertilidad (Murray J, et al., 1999). Algunas niñas pueden desarrollar amenorrea e infertilidad, aunque la mayor parte de las mujeres con FQ pueden concebir y tener hijos sanos. Los riesgos maternos y fetales dependen de la gravedad de la enfermedad pulmonar y de sus complicaciones (Thorpe-Beeston JG, 2006).

### **Alteraciones de la función de las glándulas sudoríparas**

En el sudor de los pacientes con FQ están elevados los niveles de sodio, potasio y cloruros, con concentraciones de cloruro superiores a 70 mmol/l y de sodio superiores a 60 mmol/l. La pérdida de electrolitos puede dar lugar a una significativa disminución de sales, sobre todo en los niños pequeños. Durante los meses cálidos o cuando el paciente tiene fiebre, la sudoración excesiva puede dar lugar a episodios de deshidratación hipotónica e insuficiencia cardíaca. La formación de cristales de sal y el gusto salado de la piel son signos muy sugestivos de FQ (Boucher RC, 2008).

### **Complicaciones en otros órganos**

Los pacientes con FQ se deshidratan con facilidad por la eliminación de sal en los conductos sudoríparas a causa del calor. También padecen con más frecuencia osteoartropatía, cálculos renales y osteoporosis.

**Tabla 6. Manifestaciones clínicas de la FQ**

Manifestación clínica	%
Infertilidad en varones	95%
Insuficiencia pancreática	62,0%
Síntomas respiratorios agudos o persistentes (Infecciones respiratorias persistentes o de repetición, como neumonías; accesos de tos o sibilancias, etc.).	50,5%
Retraso en el crecimiento (falta de progreso de peso y talla); pérdida de peso.	42,9%
Deposiciones anormales (abundantes y grasosas). Heces pálidas o color arcilla y con olor fétido o heces flotantes.	35,0%
Reflujo gastro-esofágico	25%
Prolapso rectal	3-20%
Ileo meconial (obstrucción intestinal en el neonato por ausencia de motilidad intestinal) en las primeras 24-48 horas de vida.	10-18%
Colelitiasis	12,0%
Diabetes mellitus	10,0%
Anormalidades en los electrolitos (sodio y cloro sanguíneos).	5,4%
Enfermedades del hígado (ictericia, cirrosis).	4-5%
Pólipos nasales y sinusitis	2,0%
Invaginación intestinal	1,0%
Otros signos y síntomas menos frecuentes: piel salada, tendencia a la fatiga, etc.	1-2%
Fuente: Paz-Valiñas L., García-Vega F.J. 2004 (10).	

### 2.3.5. Mutación $\Delta F508$

La  $\Delta F508$  fue clasificada como un tipo de mutación de clase II en base a estudios que demostraron que la proteína CFTR mutada era sintetizada pero no maduraba de manera adecuada.

Esta mutación consiste en la delección de tres pares de bases del exón 10 del *gen cftr* esta delección produce la pérdida del aminoácido fenilalanina en la posición 508, la cual afecta la síntesis del primer dominio de unión a nucleótido (NBD1), lo que resulta en un defecto en el plegamiento, y con ello una destrucción prematura de la proteína.

En la figura N° 10 se muestra parte del exón 10, y se señala la ubicación de la mutación  $\Delta F508$ . (Silva Acuña.C, 2008).



**Figura N° 10: Ubicación de la Mutación ΔF508**

### 2.3.6. Factores modificadores

Si bien existen manifestaciones clásicas y comunes entre los pacientes con FQ, la heterogeneidad clínica es muy amplia entre individuos o incluso hermanos (Castaldo G, et al., 2006) que comparten el mismo genotipo. Hay pacientes diagnosticados antenatalmente por alteraciones que son aparentes en la vida intrauterina, otros individuos tienen manifestaciones típicas de compromiso crónico de los tractos respiratorios y digestivo y son diagnosticados en la edad pediátrica, y otros son identificados como adultos con presentaciones oligosintomáticas como sinusitis crónica, azoospermia o pancreatitis recurrente. Fuera de estas diferencias en presentación inicial, el curso de la enfermedad es muy variable entre cada grupo.

Numerosos estudios, con estrategias diversas, han tratado de identificar causas que pudieran explicar la gran variabilidad clínica. Su individualización es relevante para comprender los factores involucrados en la patogénesis de la enfermedad, establecer criterios predictivos del pronóstico de la enfermedad, diseñar seguimiento y tratamientos personalizados y para identificar nuevos blancos terapéuticos potenciales.

Los factores modificadores pueden clasificarse como:

Ambientales (o no-genéticos), y

Genéticos. Estos últimos, a su vez, pueden dividirse entre variantes del mismo gen CFTR y variantes en otros genes.

Muchos estudios han abordado la búsqueda de factores modificadores de diversos aspectos de la enfermedad. Entre algunos resultados, destacan la presencia de insuficiencia pancreática, en cuyo caso, las mutaciones en el gen CFTR tienen un alto valor predictivo, ya que la presencia de al menos una mutación leve, clase 4 y algunas clase 5, se asocia a suficiencia pancreático (Kristidis P, et al.,1992).; el íleo meconial y su asociación con variantes en el gen ADIPOR2 (Dorfman R, et al.,2009); la diabetes mellitus con variantes en el gen TCF7L2, un gen previamente asociado a riesgo de diabetes en la población general (Blackman SM, et al.,2009); el desarrollo de cirrosis hepática y el alelo Z del gen SERPIN1A que codifica para la  $\alpha_1$  antitripsina (Bartlett JR, et al.,2009).

## **FACTORES AMBIENTALES**

Varios estudios han evaluado el rol de elementos ambientales que pudieran explicar parte de la variabilidad en severidad y progresión de la enfermedad. Estos factores extra genéticos son relevantes de identificar, pues son susceptibles de ser modificados.

### **a) Nivel socioeconómico**

El nivel socioeconómico es un predictor de la salud general de la población y es determinante en los resultados de muchas enfermedades. Esto también ha sido evaluado en pacientes con FQ. (Schecter et al., 2011) demostraron, en un estudio de cohorte retrospectiva en EEUU, que los pacientes con FQ pertenecientes a Medicaid (programa de seguros de salud del Gobierno de Estados Unidos para la gente necesitada) tenían mayor morbilidad, manifestada como un 10 % menos de VEF1, el doble de frecuencia de desnutrición y más del triple de mortalidad que los pacientes con FQ que no estaban en Medicaid, es decir, que recibían su cobertura de salud a través de aseguradoras privadas. Ambos grupos de pacientes eran de composición étnica similar y tenían un número y frecuencia parecida de visitas médicas ambulatorias con especialistas, sugiriendo que, en esta población, las diferencias no serían atribuibles a factores raciales o de acceso a especialistas, sino posiblemente a los múltiples efectos de la pobreza en nutrición, exposición a polución, infecciones, stress, etc.



En síntesis, el grupo de pacientes más pobres constituiría una población especialmente vulnerable y a la que debieran dedicarse esfuerzos terapéuticos adicionales.

### **b) Exposición a tabaco**

Pese a toda la información disponible sobre el efecto adverso del tabaquismo y la exposición pasiva al tabaco sobre la función pulmonar, una proporción importante de pacientes con FQ permanecen expuestos al cigarrillo en sus hogares.

Los resultados en relación a FQ y exposición pasiva al tabaco han dado resultados contradictorios: un estudio de Campbell, et al (1992) en pacientes homocigotos para la mutación p.F508del, mostró niveles significativamente menores de VEF1 y CVF en los pacientes cuyos padres fumaban tres o más paquetes diarios, que en aquellos pacientes no expuestos o con exposiciones menores. Kovesi et al (1993) reportaron, en un estudio de 350 pacientes con FQ con y sin exposición pasiva al tabaco, una mejor función pulmonar entre los no expuestos, pero la diferencia no alcanzó significancia estadística. Estas aparentes contradicciones pueden deberse a diferencias en el diseño, a que el tamaño muestral no haya tenido suficiente poder para detectar efectos, al hecho de que ambos sean retrospectivos y deban depender del reporte parental o, como se describe más adelante, a que haya otros factores que puedan modular el efecto de la exposición al humo de cigarrillo.

### **c) Estado nutricional**

La presencia de desnutrición en los pacientes con FQ se correlaciona con mayor compromiso pulmonar (medido como VEF1, CVF y puntajes radiológicos), mayor frecuencia de colonización por *Pseudomonas* y mayor mortalidad (McPhail GL, Acton JD, Fenchel MC, Amin RS, Seid M, 2008).

Estudios comparativos de centros en Inglaterra entre grandes números de pacientes que recibían cuidados en centros especializados vs. no especializados con FQ (Mahadeva R, Webb K, Westerbeek RC, et al., 1998) y entre dos centros especializados en Norteamérica (Corey M, McLaughlin FJ, Williams M, Levison H, 1988) mostraron ventajas en función pulmonar en el primer estudio y en sobrevida en el segundo, para los pacientes con mejores condiciones nutricionales. Hay evidencias de que los pacientes con insuficiencia pancreática que recuperan peso en los dos primeros años de tratamiento también tienen

mejor VEF1 a los 6 años que aquellos que no tienen una adecuada recuperación nutricional (Corey M, McLaughlin FJ, Williams M, Levison H,1988). Además, los pacientes con diagnóstico más precoz tienden a tener mejor estado nutricional en seguimiento longitudinal, lo cual ha sido confirmado en aquellas cohortes que han sido diagnosticadas de manera presintomática a través de screening neonatal e iniciado tratamiento de manera precoz (Farrell PM, et al.,2005). Estos datos enfatizan la importancia del adecuado seguimiento y manejo nutricional de los pacientes, así como los beneficios del diagnóstico precoz.

## **FACTORES GENÉTICOS**

### **a) Factores del gen CFTR, o correlación genotipo-fenotipo**

El descubrimiento del gen CFTR fue rápidamente seguido de estudios de la estructura y función de la proteína reguladora de conductancia y su rol en las superficies epiteliales en la patogénesis de la enfermedad. También se han analizado clínicamente a las mutaciones más comunes buscando asociar el tipo de mutación del paciente con la severidad de sus manifestaciones clínicas (Consortium TCFG-P,1993). Tal como se mencionó anteriormente existe una razonable correlación genotipo-fenotipo con algunas manifestaciones de la FQ. Es conocido que, en general, la presencia de insuficiencia pancreática se asocia a la presencia de al menos una mutación “leve” (clase 4 y algunas clase 5). Sin embargo, esta correlación es poco evidente para la presencia, magnitud y progresión de las manifestaciones pulmonares, como lo evidenciaron los estudios citados en este mismo párrafo.

### **b) Otros genes modificadores, no CFTR**

Los genes y sus productos no actúan de manera aislada, sino que suelen ser partes de complejas redes, finamente reguladas.

Existen varias estrategias para identificar variantes en otros genes que pudieran modificar la susceptibilidad a daño pulmonar en FQ, que evalúan mellizos, pares de hermanos o pacientes no relacionados (Cutting GR,2005). Muchos estudios recientes en FQ han sido diseñados para identificar asociación de variantes comunes en genes con la manifestación clínica de interés.

Asociación es definida como la mayor frecuencia de una variante en casos comparados con controles. Esto es importante resaltar, ya que el encontrar asociación entre un alelo de un gen y una característica de la FQ no necesariamente implica causalidad (Gutierrez HH, Sanchez I, Schidlow DV. 2009). De manera simple, los diseños de análisis de asociación se pueden clasificar en dos grandes categorías: estudios de genes candidatos, y estudios de asociación en el genoma completo (“genome-wide association study” o GWAS). En el primer caso, tal como lo señala el nombre, el investigador propone estudiar uno o varios genes basados en evidencias fisiopatológicas, biológicas, epidemiológicas, de modelos animales, etc., que hacen suponer que el gen en cuestión puede tener algún rol en la enfermedad.

En la segunda estrategia, se compara la frecuencia de miles o millones de variantes o polimorfismos entre centenas o miles de casos y controles. Los polimorfismos o variantes son las diferencias “normales” del genoma entre individuos.

Existen varios tipos de polimorfismos en nuestro genoma, pero los más estudiados en FQ corresponden a polimorfismos de nucleótido único o SNPs (single-nucleotide polymorphisms), que se encuentran en uno cada 300 a cada 1000 nucleótidos (de ahí la descripción de que los genomas de 2 personas, que tienen 3 mil millones de pares de nucleótidos cada una, se parecen en 99,9 % de sus secuencias). La mayoría de los estudios de genes modificadores de FQ han sido estudios de variantes comunes en genes candidatos, pero se están realizando estudios de GWAS también. Estas variantes comunes, tal como lo señala su nombre, son frecuentes en la población sana, y probablemente no tienen ninguna consecuencia médica evidente en las personas sin FQ, pero teóricamente sí tendrían un efecto más evidente en los pacientes con FQ.

Varias decenas de genes y variantes en ellos han sido evaluados en estudios de genes candidatos. La mayoría los analizados tienen que ver con funciones inmunológicas e inflamatorias. Un listado de los estudiados hasta hace un año atrás se puede encontrar en la revisión de Collaco y Cutting (2008). Sin embargo, pocos estudios han sido replicados en poblaciones diferentes y de éstos, algunos resultados parecen aparentemente contradictorios. Entre los genes que han demostrado asociación con alguna característica de función pulmonar en FQ en más de un estudio destacan los dos siguientes:

-TGF $\beta$ 1, que codifica para el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1. El gen se localiza en el cromosoma 19, y la proteína es una citoquina que tiene múltiples funciones, entre ellas, controlar la proliferación, crecimiento y diferenciación celular, así como inflamación y fibrosis. Se han reportado y replicado estudios de al menos 3 polimorfismos que modulan los niveles de expresión de la proteína, -509C>T en la región promotora, c.869C>T (ubicado a 509 nucleótidos antes del sitio de inicio de la transcripción), que resulta en un cambio del aminoácido Leucina por Prolina en el codón 10 de la proteína (se lo llama polimorfismo del codón 10) y c.915G>C (o cambio de Arginina por Prolina en el codón 25). Las variantes con prolina en el codón 10 y el 25, se asocian *in vitro* a menor producción de TGF $\beta$ 1. Los resultados publicados han sido contradictorios: Drumm, et al (2005), en más de 800 pacientes homocigotos p.F508del, reportaron significativamente peor función pulmonar en los homocigotos CC en el codón 10. La diferencia en función pulmonar fue aún mayor en los pacientes no-homocigotos p.F508del. Bremer, et al (2008) en un estudio más de 470 tríos, es decir, el paciente con FQ más sus padres sanos, en un diseño de estudio genético que se denomina test de desequilibrio de transmisión que se utiliza para reducir el sesgo por estratificación de la población, es decir, evitar que haya diferencias que se atribuyan a diferencias étnicas subyacentes que pueden ocurrir en un diseño caso-control convencional<sup>26</sup>, reportaron que la presencia del haplotipo (ambas variantes en un mismo cromosoma) -509C/codón 10T se asocian a mejor función pulmonar, mientras que Brazova et al en 118 pacientes de la república checa (Brazova J, et al.,2006). no encontraron evidencia de asociación de estas variantes con la función pulmonar. En contraste con los dos primeros estudios citados, Arkwright et al reportó, en 170 pacientes homocigotos p.F508del, que las variantes que causan mayor producción de TGF $\beta$ 1, es decir, codón 10T y codón 25C, se asocian a mayor declinación en función pulmonar. Las diferencias entre estos resultados pueden deberse a las poblaciones estudiadas, al poder de los estudios o a la interacción con variantes en otros genes, pero en globo, sugieren que TGF $\beta$ 1 sí tiene un rol modificador de la función pulmonar.

-MBL2, que codifica para lectina de unión a manosa. El gen está en el cromosoma 10, la proteína es secretada por el hígado y tiene un rol en la respuesta inmune al promover activación del complemento y fagocitosis de bacterias. El déficit de MBL se asocia a mayor susceptibilidad a infecciones, incluyendo neumonías. Varios polimorfismos se correlacionan con los niveles plasmáticos de la proteína. Los más estudiados son una

variante en el promotor del gen (-221G>C) y tres variantes en el exón 1 (codones 52, 54 y 57). Según las combinaciones de estas 4 variantes, los individuos pueden clasificarse en aquellos con producción alta, intermedia o baja de lectina. Varios estudios han demostrado una asociación con mayor velocidad de declinación de función pulmonar (Gabolde M, Guilloud-Bataille M, Feingold J, Besmond C ,1999) e incluso menor sobrevida en pacientes con FQ con genotipos de MBL que producen niveles más bajos de la proteína, aunque otros estudios no han encontrado evidencia de asociación (Drumm ML, et al.,2005). y otro estudio, incluso, ha encontrado resultados inversos, es decir, mayor compromiso pulmonar en los pacientes con genotipos causantes de niveles altos o intermedios de lectina (Olesen HV, Jensenius JC, Steffensen R, Thiel S, Schiøtz PO, 2006). Los estudios relacionados a genotipo de MBL y colonización con *Pseudomonas aeruginosa* o *Burkholderia cepacia* también han dado resultados aparentemente contradictorios.

Otros genes cuyas variantes se han estudiado en varias poblaciones y que parecen no tener evidencias de asociación con el fenotipo pulmonar incluyen TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), SERPIN1A (que codifica para  $\alpha$ 1 antitripsina) y ADRB2 (receptor adrenérgico  $\beta$ 2) (Collaco JM, Cutting GR,2008).

### **c) Interacción entre genes**

Se han realizado varios estudios que evalúan la interacción entre CFTR y genes modificadores (CFTR-MBL o CFTR-TGF $\beta$ 1, por ejemplo), mostrando evidencias de mayor efecto de las variantes en genes modificadores en pacientes no homocigotos para p.F508del o que tengan otras mutaciones severas (Bremer LA, et al., 2008). y entre éstos últimos (MBL- TGF $\beta$ 1)<sup>31</sup>. En este estudio de más de 1000 pacientes pediátricos canadienses, los individuos con genotipos asociados a déficit de MBL tenían, como lo descrito en los párrafos anteriores, mayor declinación de VEF1 (y también infección más precoz por *Pseudomonas*), pero que esta declinación era aún más marcada en los que además tenían genotipos asociados a alta producción de TGF $\beta$ 1.

### **d) Interacciones genes-ambiente**

Hay individuos que son más susceptibles que otros a daño frente a noxas exógenas. Estas diferencias pueden deberse, por ejemplo, a la magnitud, duración o momento de la

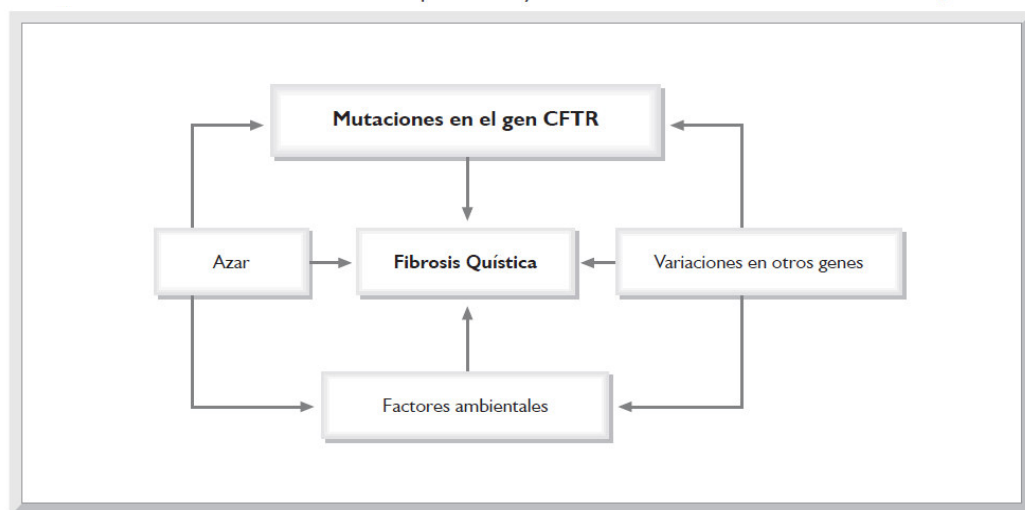
exposición, o a la condición basal de salud del sujeto, pero es también plausible considerar que existen diferencias genéticas que pueden modular la respuesta de un individuo a agentes ambientales. Como se mencionó antes, hay información contradictoria en relación al efecto de la exposición personal o pasiva al tabaco y la función pulmonar en personas con FQ. Esto pudiera explicarse por diferencias en el diseño y poder de los estudios, pero también podría ser fruto de diferencias en susceptibilidad individual de los participantes.

Un estudio retrospectivo de Collaco et al (2008) evaluó la asociación entre función pulmonar, expresada como VEF1 en seguimiento longitudinal y VEF1 estimado a los 20 años, con la exposición al tabaco en la vida intrauterina y/o intradomiciliaria, en más de 800 pacientes con FQ y relacionó los hallazgos con el genotipo CFTR (homocigotos p.F508del o no, es decir, con 1 o ninguna copia de p.F508del) y en la posición -509 en el promotor y el codón 10 del gen TGF $\beta$ 1.

Los autores encontraron que los pacientes expuestos a humo de tabaco tenían VEF1 “*cross-sectional*” y longitudinal significativamente menor que sus contrapartes no expuestos, y que el compromiso en función pulmonar entre los expuestos era aún mayor en los pacientes no-homocigotos p.F508 del.

Los homocigotos TT en TGF $\beta$ 1-509 y CC el codón 10 expuestos a tabaco también tenían mayor reducción en función pulmonar que aquellos expuestos, pero con otros genotipos. Así, por ejemplo, un paciente con FQ expuesto a tabaco tenía, en promedio, entre 6-10 puntos de percentil menos de VEF1 que uno no expuesto, y si además, tenía el genotipo

**Fig.11** - La interacción entre los factores que contribuyen a las manifestaciones clínicas de la Fibrosis Quística



09TT, la reducción en VEF1 era casi de 20 % en comparación con un individuo con FQ no expuesto. Es decir, el tabaquismo pasivo reduce la función pulmonar en pacientes con FQ, pero este efecto es de mayor magnitud en presencia de las variantes en el gen TGF $\beta$ 1. Esto sugiere una interacción gen-ambiente, y que ciertos individuos con FQ serían aún más vulnerables al efecto nocivo del tabaco.

En síntesis, la FQ es una enfermedad monogénica, pero el fenotipo o manifestaciones clínicas de los pacientes son resultado de la interacción de múltiples factores, tanto genéticos como ambientales, con las mutaciones en el gen CFTR, lo que la hace una enfermedad compleja o multifactorial (Dipple KM, McCabe ER, 2000). (Figura 1). Este resumen de algunas publicaciones sobre factores modificadores ilustra los avances como también las dificultades en su identificación. Hay estudios con resultados negativos para genes candidatos que parecían biológicamente plausibles, y con varios estudios con resultados aparentemente contradictorios. Este es un escenario común para la mayoría de las enfermedades en los que se han realizado este tipo de análisis, pero el avance y la disponibilidad de técnicas de genómica y la formación de consorcios internacionales que permiten estudiar miles de variantes en grandes números de pacientes continuarán facilitando la identificación de modificadores y contribuyendo al conocimiento de las causas de la variabilidad clínica de la FQ.

#### **2.4. ASPECTOS DIAGNÓSTICOS**

Los criterios diagnósticos de la enfermedad necesitan la presencia de 1 o más de las manifestaciones clínicas anteriores, junto con historia familiar, o el cribado neonatal positivo.

Para la confirmación del diagnóstico las pruebas complementarias son las de función pulmonar, función pancreática, test del sudor positivo al menos en dos ocasiones con valores  $> 60$  mEq/l (90% de los pacientes). Pero el diagnóstico definitivo es el genético de los dos alelos mutados, con las restricciones anotadas debidas a la gran cantidad de mutaciones. Las manifestaciones clínicas más relevantes se producen a nivel respiratorio y digestivo, siendo las respiratorias las relacionadas principalmente con la mortalidad. Aunque los síntomas suelen manifestarse en la infancia, su amplia variabilidad clínica puede demorar el diagnóstico hasta la edad adulta. Roldán A.M (2013).

Existe sospecha de fibrosis quística ante la presencia de una o más de las siguientes características fenotípicas: Echeverría I, (2011).

*Características clínicas más frecuentes agrupadas según edad* **Tabla.3**

Recién nacido	Menores de 2 años	Niños	Adolescentes y adultos
Íleo meconial	Fallo de crecimiento	Malabsorción	Pólipos nasales
Ictericia prolongada	Esteatorrea	Fallo de crecimiento	Sinusitis crónica
Tos y taquipnea persistente	Infección respiratoria recurrente/bronquiolitis	Tos crónica	Bronquitis crónica/bronquiectasias
Pobre ganancia de peso	Atelectasia persistente	Infección pulmonar recurrente/bronquiectasias	Hipocratismo digital
	Edema/hipoproteinemia	Cultivo de secreción positivo para <i>Staphylococcus aureus</i> o <i>Pseudomonas</i>	Azoospermia
	Prolapso rectal	Pólipos nasales	Cirrosis biliar
	Síndrome de depleción salina	Diagnóstico de FQ en familiar	Diabetes
			Litiasis vesicular

*Luego de confirmado el diagnóstico, se debe realizar prueba del sudor a los hermanos aunque carezcan de manifestaciones clínicas e independientemente de la edad.*

El Consenso de 1998 de la C FF estableció (Rosenstein BJ, Cutting GR, 1998) que el diagnóstico de la FQ se debía basar en la presencia de uno o más de lo siguiente (Tabla 3): uno o más rasgos fenotípicos consistentes con FQ, o historia de la enfermedad en hermanos o primos hermanos, o un test de cribado neonatal positivo (elevación de los niveles séricos de tripsinógeno inmunorreactivo), junto con pruebas de laboratorio que indicaran “disfunción del CFTR”, documentada por cualquiera de lo siguiente: concentración de cloro en el sudor elevada, identificación de mutaciones causantes de enfermedad en ambas copias del gen *CFTR*, o alteraciones características en el transporte iónico a través del epitelio nasal. Los rasgos fenotípicos consistentes con FQ eran cualquiera de los siguientes, solos o en combinación: 1) enfermedad sinopulmonar crónica sugestiva;

- 2) alteraciones características gastrointestinales y nutricionales;
- 3) síndromes debidos a las pérdidas excesivas de sal por el sudor; y
- 4) ACBVD (agenesia congénita bilateral de vasos deferentes) en los varones.

Criterios diagnósticos de la FQ (Consenso CFF )

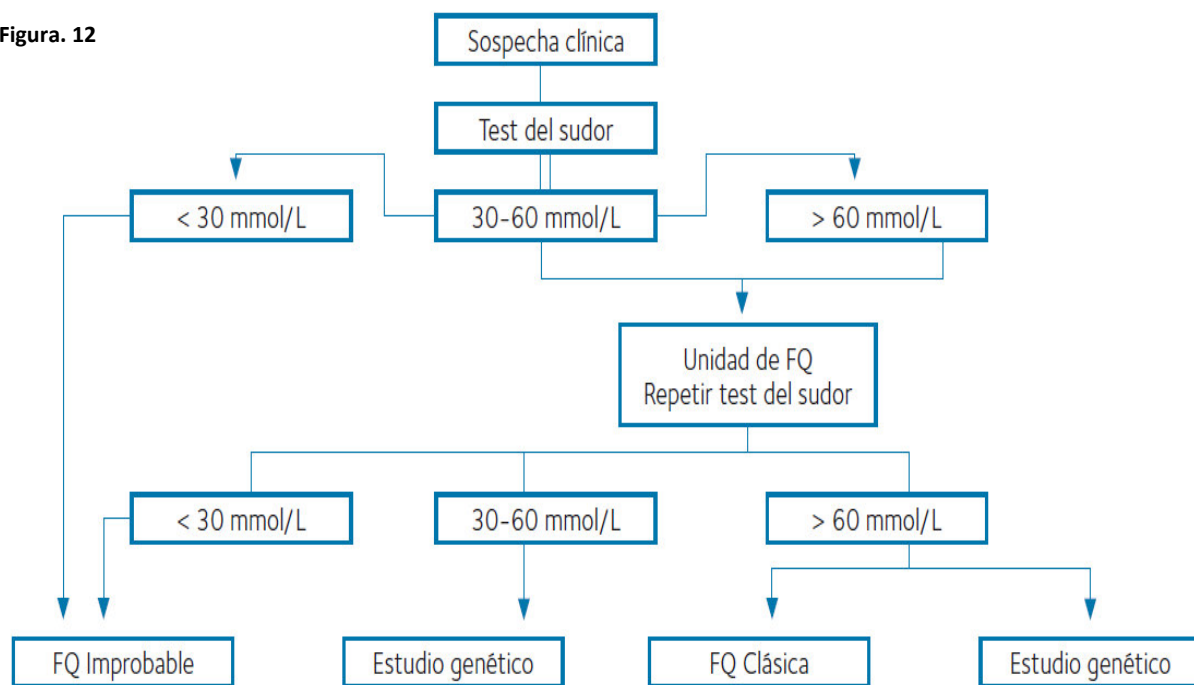


**Tabla.4** Criterios diagnósticos de la FQ (Consenso CFF)

Uno o más rasgos fenotípicos característicos	o historia de FQ en un hermano o primo hermano
	o cribado neonatal positivo (TIR)
Y evidencia de disfunción del CFTR mediante uno o más de lo siguiente	Concentración de Cl en sudor elevada en 2 ocasiones
	Presencia de 2 mutaciones causantes de enfermedad
	PD nasal anormal

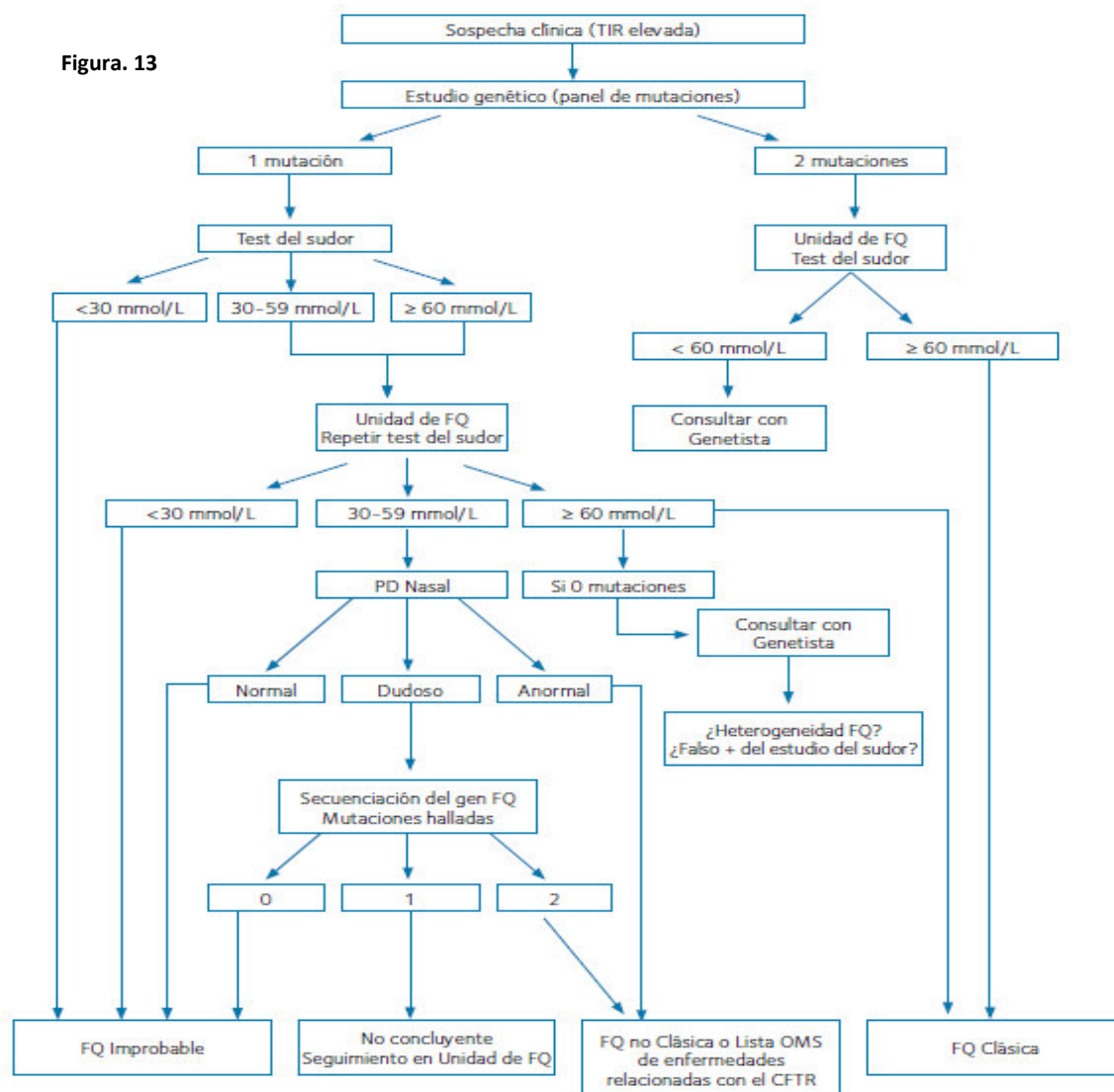
El Consenso Europeo de 2006 (10), que coloca de nuevo la clínica y el test del sudor en el centro del diagnóstico de la FQ; y propone unos algoritmos sobre la metodología diagnóstica a seguir, partiendo del resultado del test del sudor (Fig. 12) a ser utilizado en todos los casos, salvo en el del cribado neonatal, en el que se propone otro algoritmo, que parte del resultado del estudio genético (Fig. 13).

Figura. 12



Algoritmo diagnóstico partiendo del test del sudor en pacientes con sospecha clínica de fibrosis quística. *Consenso Europeo 2006. Modificado de Ref.*

Figura. 13



Algoritmo diagnóstico partiendo del estudio genético a utilizar en los programas de cribado neonatal de fibrosis quística. Consenso Europeo 2006. Modificado de Ref. 11.

Las Tablas 5 y 6 muestran la propuesta del Consenso de 2006 de diagnosticar “fibrosis quística clásica” en presencia de al menos una manifestación fenotípica, junto con una concentración de cloro en el sudor  $\geq 60$  mmol/L, y “fibrosis quística no clásica o atípica” en presencia de un test del sudor “dudoso” (definido por una concentración de cloro en el sudor de 30-60 mmol/L), o incluso “normal” (cloro  $< 30$  mmol/L), junto con la presencia de 2 mutaciones causantes de enfermedad y/o un PD nasal alterado. Vázquez C, Baranda F. (2012).

**Tabla.5** Criterios diagnósticos de la FQ (Consenso ECFS 2006)

FQ Clásica o Típica	
≥ 1 característica fenotípica + Cl sudor ≥ 60 mmol/L	Enfermedad sinopulmonar crónica Alteraciones digestivas y nutricionales Síndromes pierde-sal Agenesia congénita bilateral de vasos deferentes
Otras características	Generalmente 2 mutaciones identificadas Suficiencia o insuficiencia pancreática Evolución clínica variable

**Tabla.6** Criterios diagnósticos de la FQ (Consenso ECFS 2006)

FQ no Clásica o Atípica	
≥ 1 característica fenotípica + Cl sudor "dudoso" (30-60 mmol/L) o "normal" (< 30 mmol/L) + 2 mutaciones en el gen <i>CFTR</i> identificadas y/o PD nasal alterado	
Otras características	Suficiencia pancreática Afectación pulmonar leve Afectación de uno o más órganos

PD=diferencia potencial.

## TEST DEL SUDOR

Esta denominación es un término general que hace referencia al análisis del sudor por métodos cualitativos (determinación de la conductividad o de la osmolalidad) o cuantitativos

(concentración de electrolitos). El análisis cuantitativo, con la determinación de la concentración de cloruro en sudor, continúa siendo el "patrón oro" para la confirmación del diagnóstico de FQ (21-24). Cualquiera que sea el método utilizado, un test del sudor consta por lo general de tres partes: estimulación de la sudoración, recogida del sudor y análisis cualitativo o cuantitativo del mismo. (Landeira .C, Barrio.M y Martínez. M.2005)

La prueba mide la concentración de cloruro en el sudor. Concentraciones >60 mmol/L confirman el diagnóstico. Sin embargo, los resultados deben ser interpretados siempre por expertos, en el contexto de cada paciente. Así, niños menores de 3 meses de edad con FQ pueden presentar cifras entre 40 y 60 mmol/L de cloruros, pero para algunos adultos se han descrito estos mismos valores e incluso < 40 mmol/L. Por lo tanto para confirmar el diagnóstico por este método se recomiendan dos determinaciones positivas (Martina, P.2013).

### **Estimulación de la sudoración**

La iontoforesis con pilocarpina (Gibson LE, Cooke RE. ,1959).es el único método válido para estimular la sudoración.

Se realiza colocando dos electrodos, en los que se aloja la pilocarpina, sobre la piel de la superficie flexora del antebrazo del paciente. A continuación, se hace pasar una corriente eléctrica (máximo 1,5 mA) durante 5 minutos; este tiempo comprende un incremento regular de la corriente hasta alcanzar la intensidad referida y un descenso paulatino de la misma para evitar incomodidades al paciente.

### **Recogida del sudor**

Puede realizarse siguiendo el método clásico descrito por Gibson y Cooke(1959) o bien por el sistema *Macroduct Sweat Collection System* (Wescor, Logan UT)( Hammond KB, Turcios NL, Gibson L,1994).

En el primer caso, se coloca sobre la zona cutánea estimulada una pieza de gasa o papel de filtro que no contenga cloro y que se habrá pesado previamente. Dicha pieza se cubrirá con plástico para impedir la evaporación del sudor.

El tiempo para la obtención de una muestra válida no debe de sobrepasar los 30 minutos, lo que asegura una tasa media de sudoración mayor de 1 g/m<sup>2</sup>/min; con tasas de sudoración inferiores, la concentración de electrolitos disminuye, lo que daría lugar a falsos negativos. A continuación, y tras pesar la gasa para saber el peso del sudor obtenido, se extrae éste de la gasa o papel sumergiéndolo en un líquido de composición y volumen conocidos, procediéndose a la siguiente fase del test: el análisis del sudor. Se requiere obtener un peso mínimo de sudor: 75 mg y, preferentemente,

100 mg. Debido a su complejidad, este test está expuesto a numerosos errores metodológicos, por lo que sólo tiene valor cuando se realiza en un laboratorio con suficiente experiencia en su realización.

Con el método de recogida Macroduct (Hammond KB, Turcios NL, Gibson LE,1994).), existe menos peligro de evaporación del sudor; el sistema consiste en un tubo de plástico de pequeño calibre alojado en espiral en un disco ligeramente cóncavo con un orificio en su parte central al que se conecta el tubo de recogida. Todo el sistema se fija firmemente a la piel, por medio de unas correas, para impedir la evaporación del sudor. Éste penetra en el tubo por capilaridad, pudiéndose controlar el volumen de sudor obtenido al ser el tubo transparente y contener una pequeña cantidad de colorante azul soluble en agua; basta con

obtener un volumen de 15  $\mu$ L. Incluso puede bastar con muestras menores si se emplea un clorurómetro especial para el análisis de la muestra (Nathanson I, Tucker M, Jones L.,1994). El tiempo de recogida no debe de sobrepasar los 30 minutos por la razón mencionada previamente.

Una vez terminada la recogida, se extrae el sudor con ayuda de una jeringa para proceder a la última fase del test: el análisis del sudor.

### **Análisis del sudor**

Como ya se ha mencionado, el análisis puede ser cualitativo o cuantitativo. Como ejemplos de test cualitativos tenemos: a) la determinación de la conductividad del sudor por medio del *Sweat-Chek* (Wescor, Logan,Utah) o del *Advanced Instruments* (*Advanced Instruments*, Norwood, Mass); b) el electrodo cutáneo para cloruro (*Orion Research*, Cambridge, Mass); c) la determinación de la osmolalidad por medio de un osmómetro.

Es necesario remarcar que dichos métodos deben de considerarse exclusivamente de *screening*, por lo que, en el caso de obtener con ellos resultados positivos o dudosos, es obligada la realización de un análisis cuantitativo del sudor que determine la concentración de cloruro.

De acuerdo a la normativa de la Fundación Americana de FQ, los centros de referencia para esta enfermedad deberán realizar análisis cuantitativo del sudor. Si previamente se ha medido la conductividad por medio del *Wescor Sweat-Chek* (diseñado específicamente para su uso con el *Wescor Macroduct* y aceptado como método de *screening* por dicha Fundación), cualquier resultado  $\geq 50$  mEq/L deberá de someterse a la determinación cuantitativa de Cl<sup>-</sup>. Recordemos que la conductividad de una solución depende de la suma de los iones positivos o negativos que contiene; por lo tanto su valor es al menos 15 mEq/L superior al del Cl<sup>-</sup>, debido a la presencia en sudor de otros aniones, como lactato y bicarbonato. Cifras por debajo de 50 se consideran en principio negativas, y superiores a 80 positivas.

La osmolalidad del sudor refleja la concentración total de solutos expresada en milimoles por kilo de peso de sudor. Para determinarla se utiliza un osmómetro. Los valores normales en niños están entre 50 y 150 mmol/kg. Los niños con FQ tienen valores  $> 200$  mmol/kg; valores entre 150 y 200 mmol/kg son dudosos; tanto los resultados positivos como los dudosos requieren la realización de un test del sudor cuantitativo, siguiendo los métodos

mencionados. La determinación del ion  $\text{Cl}^-$  se puede llevar a cabo en el laboratorio, por titulación química (método de Schales y Schales), o por medio de un clorurómetro.

Se debe de determinar la concentración de  $\text{Cl}^-$  en sudor ya que, aunque el  $\text{Na}^+$  también está elevado en la FQ, existe un mayor solapamiento entre las cifras obtenidas en la población normal y en los pacientes, sobre todo en los adultos. La determinación del  $\text{Na}^+$  puede servir como control de calidad, ya que las cifras de ambos iones deben de ser similares, con  $\text{Na}^+$  ligeramente superior al  $\text{Cl}^-$  en las personas sanas, y  $\text{Cl}^-$  ligeramente superior al  $\text{Na}^+$  en los pacientes FQ.

### **Resultados del test del sudor**

Test positivo:  $\text{Cl}^- > 60 \text{ mEq/L}$ .

Test negativo:  $\text{Cl}^- < 40 \text{ mEq/L}$ .

Test dudoso:  $\text{Cl}^-$  entre 40 y 60 mEq/L.

Hay una excepción: se considera positivo un resultado  $\geq 40 \text{ mEq/L}$  en los lactantes menores de tres meses. En un estudio realizado en una población objeto de detección neonatal de FQ, Farrell et al. comprobaron que todos los lactantes no FQ y no portadores de la mutación F508del tenían una concentración de  $\text{Cl}^-$  en sudor menor de 20 mEq/L; los portadores de una mutación F508del tenían valores ligeramente más altos, aunque en más del

95% de los casos fueron inferiores a 30 mEq/L (Farrell PM, Koscik RE, 1996).

Aproximadamente el 98% de los pacientes FQ tienen concentraciones de  $\text{Cl}^- > 60 \text{ mEq/L}$ , y un 1 a 2%  $< 60 \text{ mEq/L}$ . Sólo un 4% de los adultos normales tienen cifras superiores a 60.

Algunos autores defienden la utilidad del cociente  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$ , afirmando que una relación  $> 1$ , en pacientes con concentraciones de  $\text{Cl}^-$  en el rango dudoso de FQ, apoya el diagnóstico. Según su experiencia, la mayoría de los pacientes FQ y sólo excepcionalmente los controles tienen cocientes superiores a 1. (Landeira .C, Barrio.M y Martínez. M., 2005).

### **Diagnóstico neonatal**

El diagnóstico neonatal de la enfermedad supone una excelente oportunidad para mejorar los cuidados y las consecuencias de la enfermedad, permitiendo intervenir para modificar su curso natural e implementar un tratamiento, previo a que se produzcan daños irreversibles en el individuo. Este análisis se efectúa en las primeras semanas de vida del recién nacido y se basa en la evaluación de tripsinógeno inmunoreactivo (TIR) en sangre (Ranieri E, et.al., 1994). Altas concentraciones de TIR sugieren injuria pancreática, consistente, aunque no específica con FQ. Este marcador se encuentra aumentado aún en neonatos con mutaciones del gen *CFTR* de clase IV y V asociados con insuficiencia pancreática. Los recién nacidos que exhiben una alta concentración de TIR en el examen inicial deben someterse a una nueva determinación pasadas 1 a 3 semanas del primer examen (TIR/TIR), o al análisis de la muestra inicial para determinar una mutación del gen de *CFTR* específica (TIR/DNA) (Comeau AM, et al., 2007). La ventaja del análisis TIR/TIR es que evita los problemas asociados con la detección de mutaciones de clínica desconocida.

### **Diagnóstico en la edad adulta**

En comparación con los pacientes diagnosticados en la edad pediátrica, los principales rasgos de los que lo son en la edad adulta son: suficiencia pancreática, mejor nutrición, menor frecuencia de diabetes y enfermedad hepática, y mejor supervivencia. Una reciente publicación (Keating C L, Liu X, DiMango E A., 2010) ha mostrado un incremento del porcentaje de pacientes diagnosticados en la edad adulta (> 18 años) entre los Registros de la CFF (*Cystic Fibrosis Research Trust*) de los años 1995 y 2005 (7,7% vs. 9%). En con los pacientes diagnosticados en la edad pediátrica, estos pacientes muestran una mayor proporción de infección bronquial con *Pseudomona aeruginosa* y una función pulmonar más deteriorada. En contraste, las concentraciones de cloro en sudor eran más bajas, así como el porcentaje de mutaciones F508del. Un estudio australiano reciente en 282 individuos asintomáticos y no portadores de la mutación F508del, ha mostrado que en aquellos entre 20 y 68 años de edad el límite superior del intervalo de confianza 95% de las concentraciones de cloro en el sudor estaba justo por debajo de 60 mmol/L, y 3 individuos tuvieron valores por encima de esta cifra (Mishra A, Greaves R, Massie J, 2006), de manera



que a la hora de realizar el diagnóstico de la FQ en un adulto es importante tener en cuenta las limitaciones tanto del test del sudor como de los estudios genéticos.

### **Diagnóstico molecular**

El análisis molecular tiene como objetivo la caracterización de las dos mutaciones responsables de la enfermedad. La mutación de origen paterno y materno puede ser la misma cuando se trata de una mutación prevalente en la población. (Girón .R. M, Salcedo. A y Casanova. Á,2005).

Actualmente, un número significativo de jóvenes y adultos han sido diagnosticados en forma

tardía con expresión atípica de FQ. La presencia de mutaciones *leves* podría explicar, en parte, el diagnóstico tardío. La demostración de 2 mutaciones en personas con fenotipos atípicos y valores de cloruros en sudores intermedios o normales reafirma la necesidad de realizar análisis moleculares. Esta información es crucial para la confirmación diagnóstica y el asesoramiento genético.

#### *Indicaciones para realizar estudio molecular:*

- Confirmación del diagnóstico en casos dudosos (valores de cloruros en sudor intermedios o límites).
- Diagnóstico en recién nacidos con patología sugestiva.
- Diagnóstico presintomático en recién nacidos y lactantes con sospecha de FQ por antecedentes familiares o pesquisa neonatal positiva.
- Definición genotípica de los pacientes con FQ confirmada y detección de portadores asintomáticos de la familia, para su adecuado asesoramiento genético.
- Diagnóstico de formas con presentación atípica.
- Diagnóstico prenatal en biopsia de vellosidades coriónicas o amniocentesis.
- Diagnóstico preimplantatorio.

El conocimiento del genotipo es también de utilidad para:

- Predicción de ciertas características fenotípicas, como la función pancreática (correlación genotipo-fenotipo).

- Categorización de pacientes para el diseño e implementación de futuras estrategias terapéuticas. Castaños CI, Rentería F, et al. (2008).

## **Pruebas complementarias**

### **Exámenes generales y por sistemas. Estudios microbiológicos y de imagen**

Al paciente con FQ por sistemática se le debe realizar hemograma, PCR, bioquímica completa con perfil lipídico y vitamínico, electrolitos, inmunoglobulinas séricas y coagulación completa.

Para la evaluación pancreática y de la absorción intestinal es necesario evaluar la amilasa y lipasa sérica, Test de Van de Kamer (determinación de grasas en heces), niveles de vitaminas A, D y E, test de tolerancia a la glucosa (especialmente los pacientes con pérdida de peso inexplicable, síntomas atribuibles a diabetes o antecedentes familiares de diabetes y hospitalizados con enfermedad severa. (Lago García I, 2009).

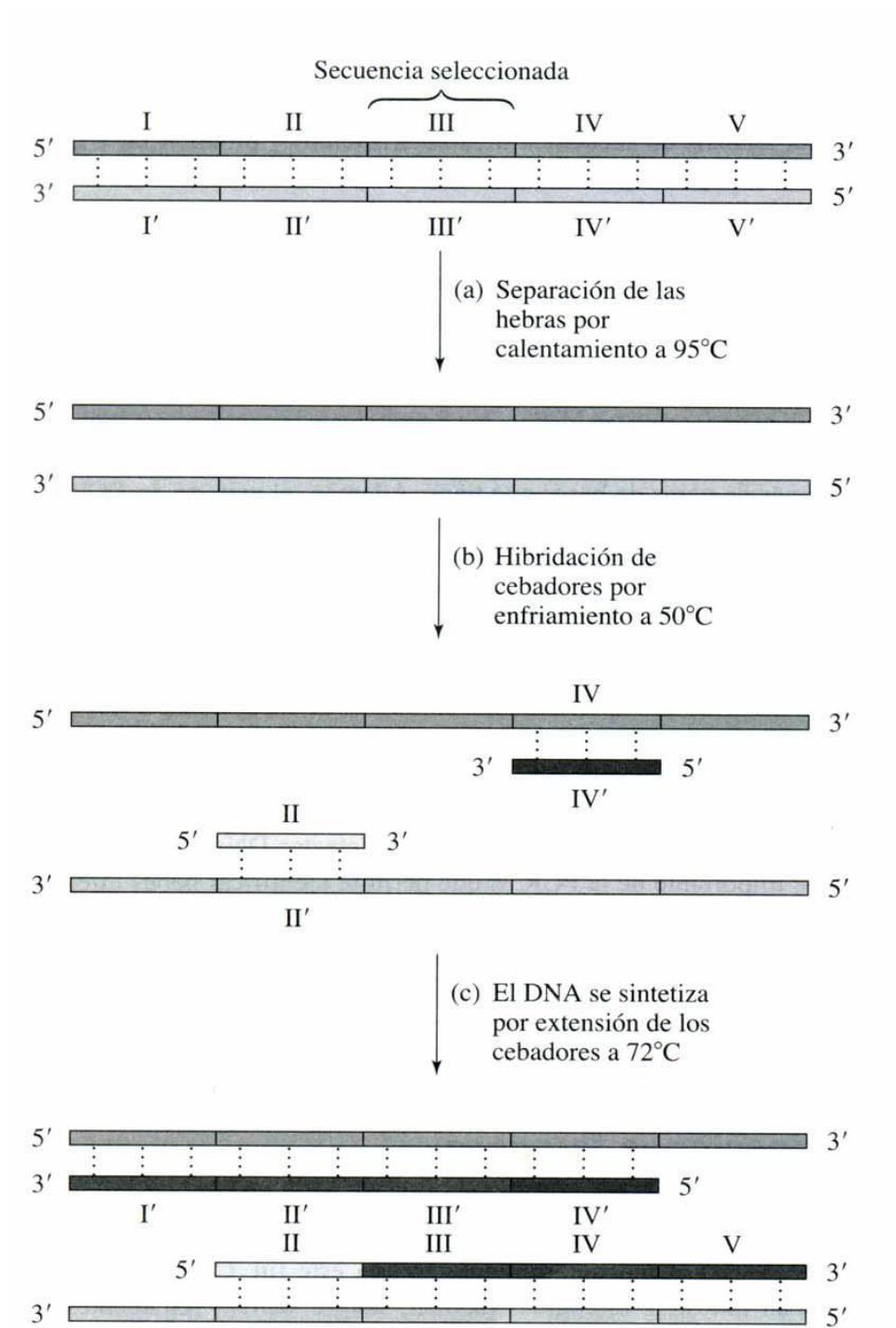
### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Este método desarrollado por Kary Mullis en 1983 (Bartlett JM, Stirling D, 2003) permite generar múltiples copias de un determinado fragmento de ADN cuando se conoce parte de la secuencia del mismo.

El ADN molde de doble hebra se divide en cinco regiones marcadas de la I a la V. (Ver figura 3.1). Las regiones complementarias son las marcadas de la I' a la V'. La región III y III' son las escogidas para amplificarse, si se conocen las secuencias de los nucleótidos de las regiones vecinas II y IV.

Los requerimientos para la PCR incluyen:

1. Dos oligonucleótidos cebadores sintéticos (*primers*) de unos 12 – 20 pares de bases cada uno, que sean complementarios con las secuencias II y IV de los flancos.
2. Una ADN polimerasa termoestable.
3. Los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato, dATP, dGTP, dCTP y dTTP.



**FIGURA 14.** La reacción en cadena de la polimerasa tiene tres etapas: a) separación de las hebras por calentamiento a 95° C, b) hibridación de los cebadores, y c) extensión de los cebadores por la síntesis de ADN. Los segmentos se marcan como I, II, III, IV y V en la hebra de ADN original y I', II', III', IV' y V' sobre la hebra complementaria. (Boyer R, 2001).

La PCR se lleva a cabo en ciclos de tres pasos. Cada ciclo consiste en:

1. Desnaturalización para separar el ADN molde, que se hace calentando una mezcla de todos los componentes a 95° C por unos 15 segundos.
2. Enfriamiento brusco de la mezcla hasta el intervalo de 37° C a 55° C para permitir que los cebadores se hibriden con las regiones de flanco apropiadas. Los cebadores se orientan sobre el molde de manera que sus extremos 3' se dirigen uno al otro. La síntesis de ADN se extiende a través de las regiones III y III'. Los oligonucleótidos complementarios localizan los puntos de partida para la duplicación del segmento de ADN deseado y sirven como cebadores 3'-hidroxilo para iniciar la síntesis de ADN. Al ADN se le añade un exceso de cebadores para favorecer la hibridación y evitar que se vuelvan a unir las hebras del ADN molde.
3. La síntesis del ADN seleccionado se cataliza por la ADN polimerasa Taq. La temperatura se eleva a 72° C para aumentar la velocidad de la reacción de polimerización. La enzima extiende ambos cebadores, originando dos nuevas hebras de ADN, II-III-IV-V y II'-III'-IV'-V'. Las enzimas son termoestables y permiten obtener una elevada tasa de síntesis de ADN. La reacción de síntesis de ADN normalmente se completa en unos 30 segundos.

La utilidad de la PCR radica en las tres etapas: desnaturalización, hibridación y síntesis de ADN; que se pueden repetir muchas veces simplemente cambiando la temperatura de la mezcla de reacción. Cada nueva hebra de ADN sintetizado puede servir de molde, de esta manera se incrementa en forma exponencial la concentración del ADN seleccionado. (Echeverría I, 2011)

## **2.5. Reacción en cadena de la polimerasa**

Básicamente, la PCR emula en un tubo de ensayo el proceso de síntesis de ADN que tiene lugar en la naturaleza amplificando fragmentos de ácidos nucleicos de forma exponencial. El proceso se lleva a cabo de forma cíclica en un termociclador y cada uno de los ciclos consta de tres fases.

**- En la primera fase o de desnaturalización**, tras la extracción del ADN de la muestra biológica, éste se calienta a 95-98 °C durante 30-90 segundos, de tal modo que merced a

la sensibilidad del ADN a temperaturas elevadas se rompen los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos hebras del ADN y éstas se separan.

- A continuación en la **fase de acoplamiento**, los cebadores, que son moléculas de ADN monocatenario previamente diseñadas, se unen al lugar complementario de la hebra del ADN diana desnaturalizado previamente. Esta fase tiene lugar a una temperatura entre 45 y 65 °C durante 30-90 segundos y precisa de los cebadores porque todas las polimerasas necesitan un fragmento de cadena doble de ADN que les indique dónde comenzar a incorporar nucleótidos. Inicialmente se empleó una ADN polimerasa de un *E. coli*, pero ésta se destruía a temperaturas elevadas, por lo que era preciso reponerla en cada ciclo. Esto se subsanó con el descubrimiento en el parque nacional de Yellowstone del *Thermus aquaticus*, que es una bacteria que vive a 75 °C en los geiser de dicho lugar y cuya polimerasa no se degrada con el calor.

- Finalmente, una vez acoplados los cebadores al ADN diana, la ADN polimerasa comienza a actuar incorporando los nucleótidos presentes en la mezcla y sintetizando así una copia de cada una de los dos hebras del ADN diana. Esta última fase del proceso tiene lugar a 70-75 °C durante 30-180 segundos.

Así pues, este proceso se repite  $n$  veces, de tal manera que en condiciones ideales se obtendrían  $2n$  copias de la región adyacente a la zona complementaria a los cebadores.

Una vez terminada la serie de ciclos es preciso detectar e identificar el ADN producto de la reacción, lo cual se logra por medio de diversas técnicas. Dos de las más populares son la electroforesis y ELISA.

Vamos a suponer que esperamos un solo fragmento de un tamaño determinado, (ver el primer ciclo de la figura 1): el termociclador calienta o enfría los tubos a tres temperaturas distintas, que se repiten una y otra vez (lo que se llama los ciclos de reacción), la primera es a 95 °C (y a este paso se le llama desnaturalización) durante la cual las dobles cadenas del ADN se abren o desnaturalizan, quedando en forma de cadenas sencillas; después el termociclador ajusta la temperatura en un intervalo entre 40 y 60 °C (llamada de alineamiento), a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el ADN, y aquellas uniones mas estables (las que son complementarias) durarán mayor tiempo, quedando los oligonucleótidos “alineados” formando una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3'; al agregar unas

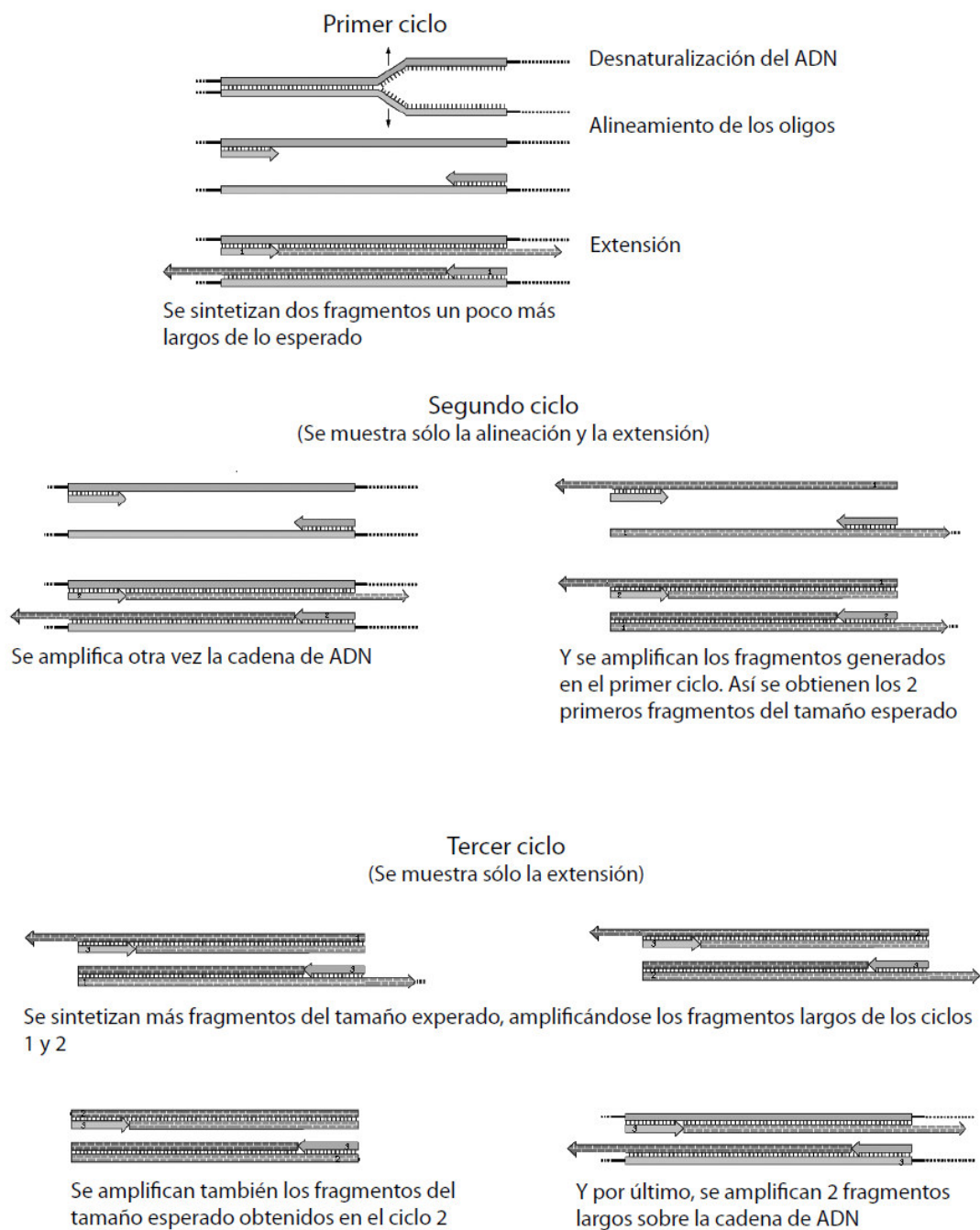
bases más, los puentes de hidrogeno que se forman entre las bases estabilizan mas la unión y el oligonucleótido permanece en este sitio para el siguiente paso. Después la temperatura sube a 72 °C (paso que se conoce como extensión), ya que 72 °C es la temperatura en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad, y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado.

En el primer ciclo, con estas tres temperaturas se sintetizaran los primeros fragmentos a partir del ADN genómico. Estos primeros fragmentos no tendrán el tamaño esperado, serán un poco más grandes ya que la *taq* copiará hasta donde le sea posible, pero como veremos más adelante, se obtendrán en cantidades tan pequeñas que al final no podremos detectarlos. Después se repiten una vez mas las tres temperaturas, pero en este segundo ciclo, los oligonucleótidos, además de unirse al ADN que pusimos al inicio, también se unirán a los fragmentos recién sintetizados del primer ciclo (ver segundo ciclo de la figura 1), por lo tanto en este segundo paso la polimerasa sintetizará 2 fragmentos largos copiados directamente del ADN y 2 fragmentos del tamaño esperado, que es el tamaño que hay entre los dos oligonucleótidos que hemos usado. De esta forma, con cada ciclo aumentará el número de fragmentos del tamaño que queremos. Cabe mencionar que antes y después de estos ciclos se programan dos pasos, uno de 95 °C durante varios minutos para iniciar con desnaturalización, y al final de los ciclos, un paso último de extensión a 72 °C para permitir que la *taq* termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos.

Para este tipo de PCR es necesario que uno de los oligonucleótidos tenga la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas del ADN, y el otro deberá llevar la secuencia complementaria que estará al final del fragmento que se quiere amplificar (por lo cual se les llama *forward* y *reverse*) para que uno sea complementario a la cadena que forma el otro; si no es así no podría amplificarse el sitio que se necesita. Como cada pedazo sintetizado sirve como base para sintetizar otros en el siguiente ciclo, el número de copias aumentará en forma exponencial (ver tercer ciclo de las figuras 1 y 2). Con una sola molécula de ADN, en el ciclo 1 se producen  $2^1=2$  nuevos fragmentos, en el ciclo 2 serán 22, esto es, 4 fragmentos recién sintetizados, y así, con 35 ciclos de PCR se producirán  $2^1+2^2+\dots+2^{34}+2^{35}= 2^{36}$  nuevos fragmentos, de los cuales solo 70 serán fragmentos de

un tamaño mayor al esperado (2 por cada ciclo) obtenidos al sintetizarlos directamente del ADN genómico; esta pequeña cantidad es casi imposible de detectar al analizar nuestros productos.

**Fig.15** Descripción del proceso de un PCR en los primeros ciclos de reacción. Comúnmente se utilizan 35 ciclos para amplificar el fragmento que se requiere (modificada de Parkes, 2003)

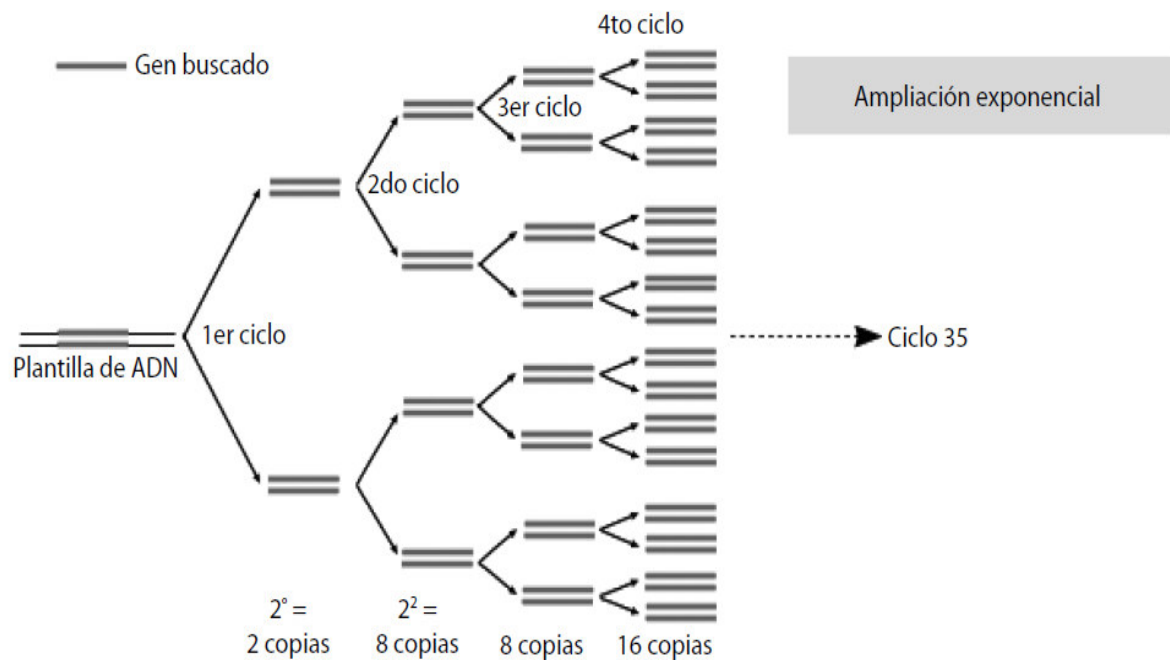


Fuente: Parkes H. 2003. Food for Thought [http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1999/parkes\\_may99.htm](http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1999/parkes_may99.htm), accesado 08/03.



Tipos de técnicas: El PCR tiene diferentes métodos o aplicaciones en función de lo que nos interese investigar (como son los RAPDs, AFLPs, ISSRs, SSCP) y el primer paso es tener claro el tipo de información que necesitamos para elegir o diseñar la estrategia más apropiada para nuestro trabajo.

Fig.16 . En una reacción de PCR los fragmentos se amplifican en forma exponencial (tomado de Vierstraete, 2001)



Brevemente podemos dividir la técnica en dos categorías:

1) PCRs para la amplificación de un solo sitio conocido del genoma (locus).

Estos PCRs requieren conocer la secuencia que se trabaja (por ejemplo cuando amplificamos un gen específico como el 16S), en cuyo caso se utilizan oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de ese gen y se obtiene un solo fragmento de un tamaño ya conocido. Con este tipo de PCRs es posible hacer filogenias, y para obtener los datos

hay distintos caminos: desde hacer geles especiales que detectan cambios hasta de una sola base entre las secuencias (SSCP), hasta utilizar enzimas de restricción para generar patrones de cada individuo, aunque lo ideal es obtener la secuencia completa del gen que amplificamos, sobre todo cuando se desea responder a preguntas relacionadas con las fuerzas evolutivas que han actuado sobre él.

2) PCRs en los que no es necesario conocer la región que se está amplificando (se amplifican regiones no conocidas, como zonas hipervariables del genoma), por lo cual no se sabe el tamaño del fragmento (o fragmentos) que se esperan. Estos se utilizan para determinar polimorfismo genómico y son los más comunes para *fingerprint*, ya que es sencillo obtener los datos (un gel de agarosa después del PCR es suficiente), se observan varios loci simultáneamente y la información de las zonas variables permite inferir los datos necesarios para análisis de genética de poblaciones.

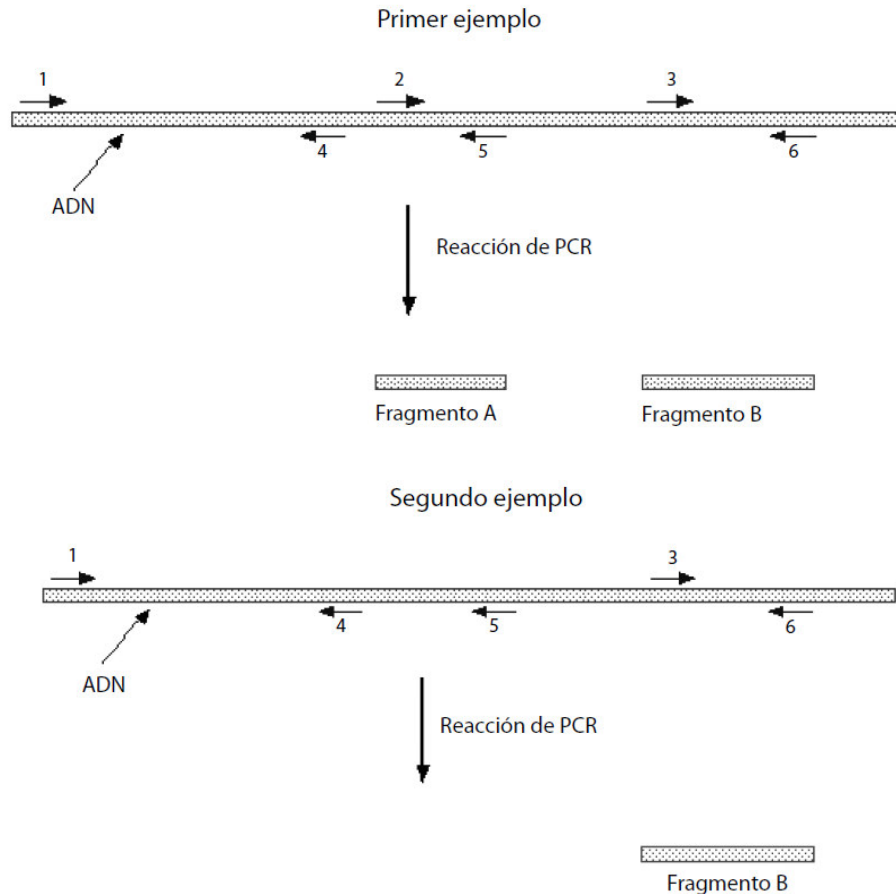
En general este tipo de PCRs utiliza un solo oligonucleótido con 2 características importantes: que sea de pequeño a mediano (de 6 a 18 bases) y sobre todo que su secuencia esté presente muchas veces en el ADN del organismo que estudiamos. Existen zonas repetidas hipervariables del ADN que pueden amplificarse de esta manera, por ejemplo los sitios que sirven para iniciar la síntesis de ADN en los cromosomas, conocidas como microsatélites.

En el primer ciclo de reacción lo que sucederá es que el oligonucleótido utilizado hibridará en distintas zonas del ADN, y primero comenzarán a sintetizarse fragmentos de tamaños variables e indefinidos (hasta donde la polimerasa logre copiarlos).

En el segundo ciclo las cadenas sintetizadas a partir de las primeras copias formadas serán del tamaño que existe entre dos oligonucleótidos que no estén muy alejados entre sí. Estos fragmentos se copiarán una y otra vez, y de esta manera al final obtendremos muchos fragmentos de tamaños diferentes, de los que conoceremos la secuencia con que inician y terminan, pero no la secuencia completa de cada uno.

En la figura 17 se explica con más detalle un PCR de este tipo.

Fig.17 Los PCR que amplifican zonas no conocidas utilizan oligonucleótidos pequeños y amplifican zonas repetidas en el genoma (tomado de Harlocker, 2003)



En el segundo ejemplo hay que suponer que es un individuo que tiene un cambio en el segundo sitio, y el oligo no se ha unido en la segunda posición, por lo tanto sólo se genera el fragmento B.

### 2.5.1. Aplicaciones en Medicina Interna

La PCR ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas en numerosos campos de la medicina. Existen métodos de detección por PCR de agentes infecciosos como los virus de la hepatitis B y C, del papiloma y del sida. También pueden detectarse otros microorganismos patógenos como las clamidias, las micobacterias que causan tuberculosis, los *Helicobacter* causantes de gastritis y los tripanosomas responsables de la enfermedad de Chagas. La manera clásica de diagnosticar enfermedades infecciosas causadas por virus, consiste en detectar los anticuerpos que el paciente produce contra el virus. Si hay anticuerpos circulantes se sabe que hay o hubo infección, pero no se puede

distinguir entre las dos posibilidades. En cambio, la detección directa del genoma del patógeno mediante PCR permite saber con certeza si hay o no infección en el momento del análisis. La PCR ha facilitado también el diagnóstico de enfermedades hereditarias. Talasemias y otras anemias, fenilcetonuria, hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, fibrosis quística, poliquistosis renal, retardo mental asociado a fragilidad del cromosoma X, corea de Huntington, enfermedades de Sandhoff y de Gaucher constituyen los ejemplos más notorios. Los genes responsables de estas enfermedades han sido aislados y caracterizados y se encuentran disponibles pruebas diagnósticas seguras de estas enfermedades. En enfermedades oncológicas pueden detectarse por PCR mutaciones de oncogenes. Estas mutaciones pueden llevar a la generación de tumores. En algunos casos, saber cuál es el oncogen mutado puede permitir diagnosticar prematuramente cánceres de naturaleza hereditaria o establecer pronósticos. La PCR permite también evaluar el riesgo de padecer trastornos autoinmunes tales como diabetes insulino dependientes, enfermedad celíaca y esclerosis múltiple. En estos casos se analizan los genes de los antígenos de histocompatibilidad o HLA. Si bien estos genes no son los responsables directos de las enfermedades autoinmunes, existe una correlación comprobada entre la presencia de ciertas variantes de los genes HLA y el riesgo de padecerlas. (Cortés E. y Morcillo G ,1999).

### **Diagnóstico de enfermedades hereditarias**

La PCR es muy útil en las enfermedades originadas por mutaciones puntuales. Se ha descrito más de 20 mutaciones en el gen asociado a la fibrosis quística (el regulador de conductividad transmembrana de la fibrosis quística). Sin embargo, la anomalía más frecuente, presente en el 80% de los portadores, es la delección de 3 pares de bases que originan la pérdida de un único aminoácido de fenilalanina en la posición 508 (Delta-F508). La detección de esta alteración fácil utilizando preamplificación de la secuencia lindante mediante PCR, que incluso puede ser automatizada

Sin embargo, en algunas familias, en las que la naturaleza exacta del defecto es desconocida, linkage analysis es necesario, a pesar de sus limitaciones

En el caso de enfermedades atribuibles a defectos en múltiples genes, su demostración es más difícil. Por ejemplo, en la enfermedad vascular coronaria, las mutaciones en los genes del receptor de LDL y de ApoB, así como los polimorfismos de los loci ApoE y Apo(a) pueden contribuir conjuntamente al riesgo .

En el xeroderma pigmentoso, un término que incluye varias enfermedades distintas, todas ellas caracterizadas por un defecto en la reparación del daño en el ADN inducido por radiación ultravioleta<sup>162</sup>, el daño por rayos ultravioleta afecta a muchos genes y cromosomas. Uno de ellos es el oncogén N-ras, cuyo codón 61 es sensible a la radiación ultravioleta. Esta forma mutada del gen es capaz de producir tumores<sup>163</sup>. también el gen supresor p53, amba mencionado juega un importante papel en la aparición de carcinomas epidermoides en esta enfermedad. El gen del xeroderma pigmentoso A se localiza en 9q22,3, la misma región (9q22,3-q31) que el gen del síndrome de epiteloma basocelular nevoide (NBCCS).

En la eritroqueratodermias (como la queratodermia palmoplantar o la eritroqueratodermia simétrica progresiva) se ha detectado mutaciones en el gen loricrina.

El análisis de mutaciones en el ADN mitocondrial mediante PCR parece ser un marcador útil de la exposición acumulada a rayos ultravioleta, y se ha utilizado como marcador de la relación entre la edad cronológica y "foto-edad" de la piel. Al parecer las mutaciones aparecen más en dermis (fibroblastos) que en epidermis, lo que concuerda que la ausencia de estas mutaciones en tumores epidérmicos .

Las alteraciones del ADN mitocondrial también puede conllevar anomalías en el pelo y erupciones cutáneas pigmentadas, como se ha demostrado en pacientes con trastornos mitocondriales.

<b>TABLA 7. Alteraciones cromosómicas en el albinismo</b>			
<b>Tipo de albinismo</b>	<b>Locus</b>	<b>proteína codificada</b>	<b>Cromosoma</b>
OCA tipo 1	TYR	Tirosina	11q21
OCA tipo 2	F	proteína rosa	15q11,2-q12
OCA tipo 3	TYRP1		9p23
Síndrome de Hermansky-Pudlak	HPS1	Proteína de membrana Subunidad beta-3	1-q24
	ADTB3A	del complejo proteína adaptadora(AP-3)	T3qT3
Síndrome de Chedlak-Higashi	CHST	Proteína de memoria	Tq43
Albinismo ocular tipo 1	OAI	Proteína de membrana	Xp22.3
OCA= Albinismo oculocutáneo			

En el edema angioneurótico hereditario es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones que reducen la producción de inhibidor de el funcionante, y que conlleva a la producción de bradiquinina y subsiguiente edema de superficies cutáneas y mucosas. En el cribado de mutaciones para detectar esta enfermedad se ha observado que participan secuencias del genoma sensibles a errores de replicación, denominadas repeticiones invertidas imperfectas (cuasi-palíndromo) .

El albinismo ha sido extensamente estudiado y se conoce la existencia de múltiples mutaciones en cada una de sus variantes. La Tabla 5 recoge algunos de los genes implicados en estos síndromes. (*García-Rojo M, Morillo-Castro A,1999*).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Diseño del Estudio

Es un estudio descriptivo - serie de casos.

#### 3.2. Universo

Familiares de pacientes con FQ inscritos en la Asociación Nacional contra la Fibrosis Quística.

#### 3.3. Población de estudio

##### 3.3.1. Población

Se seleccionaron 21 familiares de pacientes con diagnóstico de FQ y que cumplían con los criterios de inclusión del estudio. De las 21 personas que aceptaron participar voluntariamente, 11 fueron varones y 10 mujeres. Las edades de los participantes fueron entre 3 y 52 años. A todos los familiares y apoderados se les dio a conocer el propósito del estudio, se les explicó las bases genéticas de la enfermedad y las consecuencias en los familiares. Además se les explico las condiciones de participación en el estudio dejando en claro que es libre. Después, a todos los voluntarios se les hizo firmar una carta de consentimiento informado.

##### 3.3.2. Criterios de Inclusión

a) Familiares de pacientes diagnosticados con FQ de ambos sexos según el consenso americano de FQ que se basa en el diagnóstico de la enfermedad tomando criterios clínicos como enfermedad pulmonar y sinusal crónica, alteraciones gastrointestinales y nutricionales, síndrome de pérdida de sal y métodos de laboratorio como dos pruebas de sudor positivo o diferencia del potencial transnasal transepitelial anormal, que estén inscritos en la Asociación Nacional contra la Fibrosis Quística.

b) Aceptación de sus padres, familiares o apoderados mediante la firma del consentimiento informado.

##### 3.3.3. Criterios de Exclusión

Pacientes que no cumplan con los dos requisitos de inclusión.

### **3.3.4. Técnica de Muestreo**

- Se enumeró correlativamente a los participantes del estudio que cumplían con las características de inclusión establecidas.
- Los pacientes acudieron al Servicio Académico Asistencial de Análisis Clínicos (SAAAC) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. En algunos casos, se realizó visitas domiciliarias.

### **3.4. Muestra Biológica**

De cada paciente se extrajo 5,0 mL de sangre venosa (vena cefálica media), en tubos vacutainer con EDTA y sin anticoagulante (para la determinación del perfil lipídico); las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta su procesamiento.

### **3.5. Lugar de ejecución de las muestras biológicas**

En el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, se realizó el estudio de las muestras mediante la técnica RFLP-PCR.

## **3.6. MÉTODOS**

### **3.6.1. Genotipificación de la mutación $\Delta F508$**

#### **3.6.1.1 Extracción y purificación del ADN genómico**

Para la extracción del ADN se utilizó un protocolo basado en solventes orgánicos (fenol - cloroformo). Se emplearon 100  $\mu$ L de sangre que fue homogenizada con 700  $\mu$ L de buffer QLB ( Tris 100 mM, NaCl 100 mM, Urea 2 M, SDS 1%) y 15  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL), se incubó a 56 °C por 12 horas. Concluido el tiempo, se adicionó 800  $\mu$ L de fenol, se homogenizó y centrifugó a 9000 rpm por 4 min. La fase acuosa de aproximadamente 600  $\mu$ L se transfirió a un tubo de 2 mL, se adicionaron 600  $\mu$ L de la mezcla fenol – cloroformo en la proporción 1:1, se homogenizó y centrifugó a 9000 rpm por 5 min. La fase acuosa de aproximadamente 500  $\mu$ L se transfirió a un tubo de 2 mL, se adicionaron 500  $\mu$ L de cloroformo, se homogenizó y centrifugó a 9000 rpm por 5 min. A la fase acuosa



se le adicionó 500 µL de isopropanol, se homogenizó y se guardó a –20 °C por 30 min. Después se centrifugó a 9000 rpm por 9 min. y se descartó el sobrenadante, el precipitado se lavó con 500 µL de etanol al 70 %, se centrifugó a 9000 rpm por 10 min. El precipitado se secó a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió el ADN en 50 µL de buffer TE.

### **3.6.1.2. Amplificación del exon 10 del gen *cftr***

En la amplificación de la región del exón 10 del gen *cftr* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Las condiciones de reacción fueron:

#### **1.1. Volumen de reacción**

Se empleó un volumen de 25 µL que contenía: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 200 µM, cebadores 0,5 µM de c/u, *Taq* ADN – polimerasa 1 U y ADN 100 ng.

#### **1.2. Cebadores específicos**

Se utilizaron los cebadores específicos para amplificar la región génica donde se describe la mutación ΔF508. Las secuencias de ambos cebadores son:

(F) 5'- GCACCATTAAGAAAATATGAT -3'

(R) 5'- CATTACAGTAGCTTACCCA -3'

#### **1.2.1.1.1. Condiciones de amplificación**

Se utilizó un termociclador (Perkin Elmer 2400), donde se realizó una primera desnaturalización a 94 °C por 4 minutos y luego 35 ciclos con las siguientes etapas y condiciones:

**Desnaturalización:** 94 °C por 45 segundos

**Hibridación:** 55 °C por 1 minuto

**Extensión:** 72 °C por 45 segundos

Finalmente se realizó una extensión de 72 °C por 7 minutos.

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE 1 X, se utilizó como marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb (Invitrogen), el cual contiene fragmentos de ADN entre 0,5 a 12 kb.

#### **3.6.1.3. Restricción de los productos amplificados**

A 1 µg de cada producto amplificado se añadió 5 U de *MboI* (enzima de restricción), las condiciones de reacción fueron realizadas según las especificaciones del fabricante, a excepción del tiempo de incubación que fue de 12 horas a 37 °C.

Luego de este período, los productos de la digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 3,5 % empleando como tampón TBE 0,5 X. La electroforesis se realizó durante 3 horas, primero a 80 voltios por 1 hora y luego a 60 voltios por 2 horas. Se utilizó como marcador de peso molecular DNA ΦX174 cortado con *Hae III*. Este marcador presenta 11 fragmentos de ADN entre 72 a 1353 pb. Finalmente, los geles de agarosa conteniendo el ADN se colorearon con bromuro de etidio 10 µg/mL y se observaron a través de un transiluminador UV (UVP Ultra-Violet Products).

#### **3.6.2 Análisis de los productos de restricción**

Los tamaños de los fragmentos de restricción se analizaron en base al marcador de peso molecular y comparando con los controles positivos con y sin la mutación ΔF508.

### 3.6.3 Determinación de parámetros bioquímicos

#### 3.6.3.1 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

Método enzimático

##### Fundamento:

La glucosa reacciona con el reactivo enzimático que contiene una mezcla de enzimas glucosa oxidasa (GOD) y peroxidasa (POD).

En la primera etapa la glucosa es oxidada a ácido glucónico por la acción de la enzima GOD, liberándose como producto  $H_2O_2$ , el cual en una reacción mediada por la enzima POD, reacciona con el ácido p-hidroxibenzoico y 4-aminoantipirina produciéndose un compuesto coloreado con un máximo de absorción a 505 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.(15)



##### Cálculos:

$(A) \text{ Muestra} \times 100 = \text{mg/dL de glucosa en la muestra}$

$(A) \text{ Patrón}$

Concentración del Patrón (valor referencial) = 100 mg/dL

**Valores normales:** 60 – 110 mg/dL

#### 3.6.3.2 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL

Método enzimático (colesterol oxidasa/ peroxidasa) con colorimetría según Trinder.

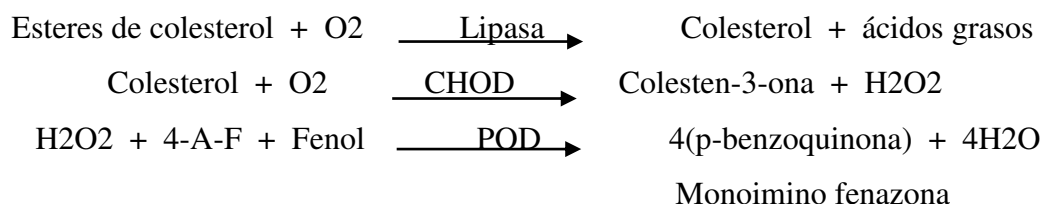
##### Fundamento

El colesterol es oxidado enzimáticamente por el colesterol oxidasa previa hidrólisis enzimática de los esteres mediante una lipasa fungal.

El agua oxigenada generada en la oxidación, produce la copulación oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona (4-AF), mediante la reacción catalizada por la peroxidasa (POD).

El producto es una quinonimina de coloración roja que es directamente proporcional al contenido de colesterol, con absorbancia máxima a 505nm.

La secuencia reaccional es la siguiente:



### Cálculos:

(A) Muestra x 200 = mg/dL de colesterol en la muestra

(A) Patrón

Concentración del Patrón (valor referencial) = 200 mg/dL

### Valores normales:

Deseable: 200mg/dL

Moderadamente alto: 200 – 239 mg/dL

Elevado:  $\geq 240$  mg/dL

### 3.6.3.3 DETERMINACIÓN DE HDL - COLESTEROL

Método enzimático, reactivo precipitante para la separación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en suero.

#### Fundamento

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se separan precipitando selectivamente las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL) mediante el agregado de sulfato de dextran de PM 50.000 en presencia de iones  $\text{Mg}^{++}$ .

En el sobrenadante separado por centrifugación, quedan las HDL y se realiza la determinación del colesterol ligado a las mismas, empleando el sistema enzimático colesterol oxidasa/ peroxidasa con colorimetría según Trinder (Fenol/ 4 – Aminofenazona) descrita en el (4.2).

**Cálculos:**

El valor del HDL-colesterol en suero se obtiene empleando la siguiente fórmula:

$(A) \text{ Muestra} \times 45.7 = \text{mg/dL de colesterol-HDL en la muestra}$

$(A) \text{ Patrón}$

Concentración del Patrón (valor referencial) = 45.7 mg/dl.

**Valores normales:** 40 - 60 mg/dL

**3.6.3.4 DETERMINACIÓN DE LDL - COLESTEROL**

Una vez obtenidas las concentraciones séricas de colesterol total, triglicéridos y HDL-colesterol se puede calcular el valor del LDL-colesterol de acuerdo a la fórmula de Friedewald.(15)

$$\text{LDL-Colesterol(mg/dL)} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL-colesterol} + \frac{\text{triglicéridos}}{5})$$

**3.6.3.5 DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS**

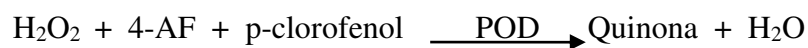
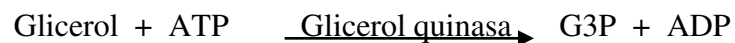
Método enzimático – colorimétrico (GPO/POD)

**Fundamento**

Los triglicéridos son desdoblados en glicerol y ácidos grasos mediante lipoproteinlipasa (LPL). El glicerol así producido se determina en forma enzimática mediante la fosforilación. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina -5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por GPO.

Al final, el peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) con formación de una quinonimina roja cuya absorbancia se lee a 505 nm.

La secuencia reaccional es la siguiente:



### **Cálculos:**

(A) Muestra x 200 = mg/dL de colesterol-HDL en la muestra

(A) Patrón

Concentración del Patrón (valor referencial) = 200 mg/dL

### **Valores normales:**

Hombres: 40-165 mg/dL

Mujeres: 35 - 135 mg/dL

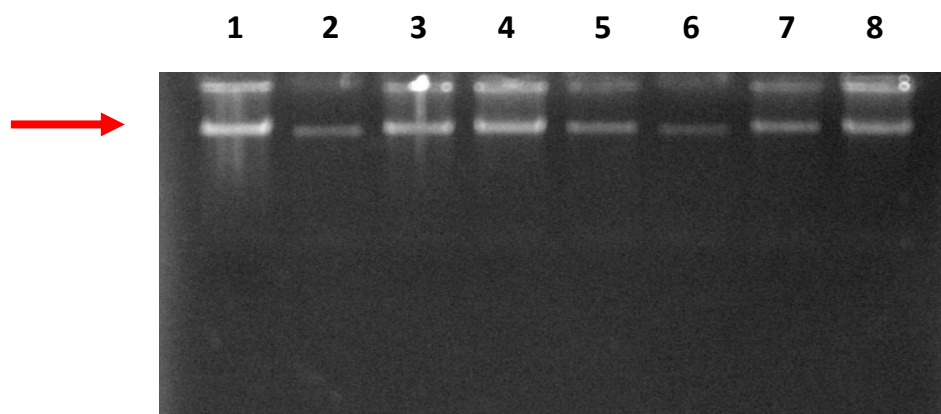
## IV. RESULTADOS

### 4.1. Pacientes

El estudio fue realizado luego que los familiares y los apoderados de menores de edad firmaran un consentimiento informado, previo a su inclusión en el estudio. Se estudiaron 21 personas, cuyas edades estaban entre los 3 a 52 años. Todos ellos eran familiares de pacientes con un diagnóstico clínico concluyente de FQ.

### 4.2 Extracción de ADN genómico

La extracción y purificación del ADN aplicando el método de solventes orgánicos fenol: cloroformo resultó ser óptimo en las 21 extracciones, en el 100 % de las muestras se obtuvo ADN genómico que permitió amplificar el gen CFTR (Figura 18).



**Figura 18.** Gel de agarosa al 1% mostrando ADN genómico extraído con el método de solventes orgánicos. Líneas (1 al 8) ADN genómico de muestras de sangre de familiares de pacientes con Fibrosis Quística.

### 4.3. Reacción en cadena de la polimerasa

#### 4.3.1. Productos de PCR y digestión

Los tamaños de los productos amplificados del gen CFTR fueron 219 pb en el alelo normal y 216 pb en el alelo mutado. (Figura 19)

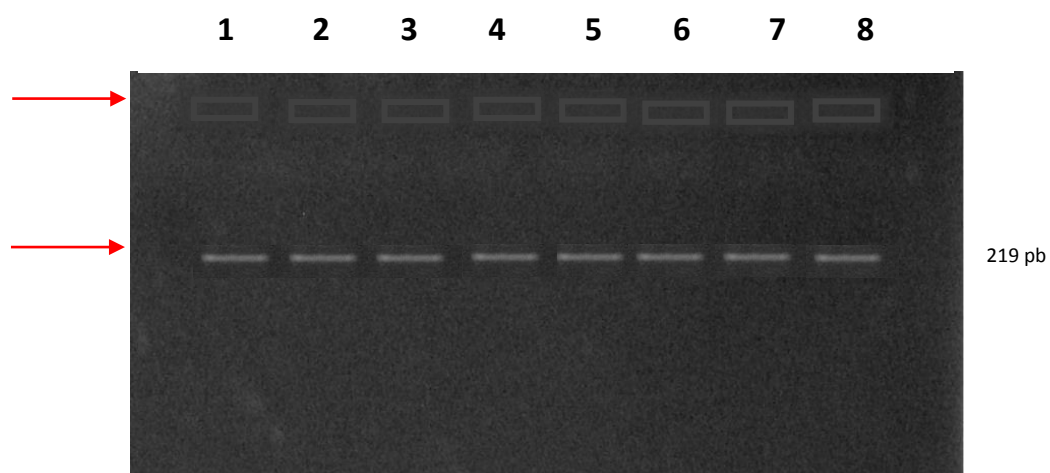
Los productos amplificados y cortados con *Mbo I* de las 21 muestras se separaron en geles de agarosa al 3 %. (Figura 20)

El alelo normal presentó un sitio de corte para la enzima *MboI*, obteniéndose

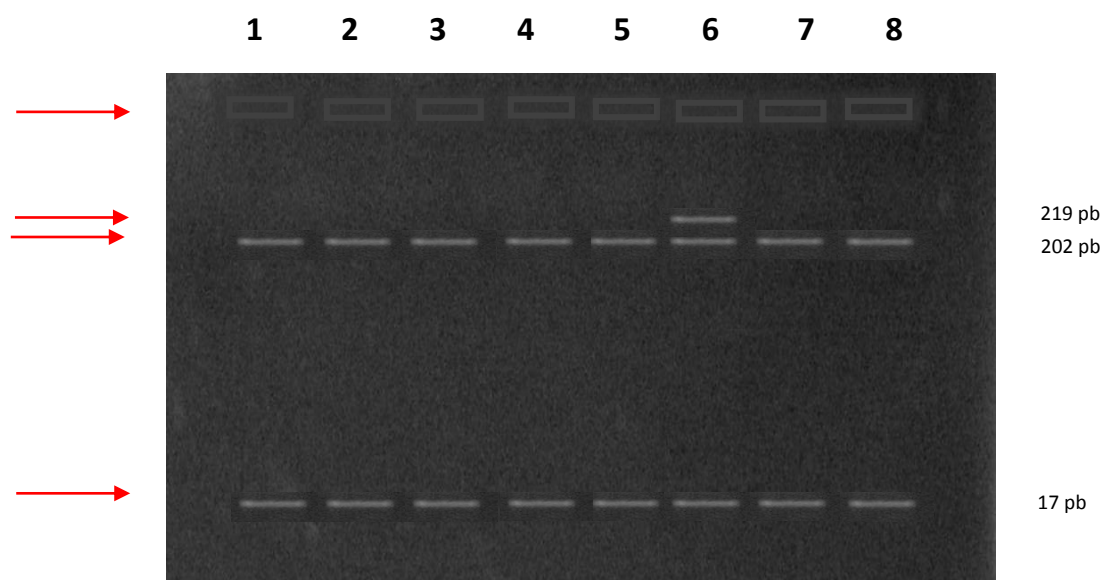
fragmentos de 202 y 17 pb y el alelo con la mutación  $\Delta F508$  no modificó su tamaño.

La mutación  $\Delta F508$  fue encontrada en 5 de los 42 alelos estudiados correspondientes a los 21 familiares (Tabla 8).

El genotipo de  $\Delta F508$  CFTR se presenta en la Tabla 9, se formó un grupo denominado OTRO, con la finalidad de hacer referencia a otras mutaciones no estudiadas en el trabajo de investigación. El más frecuente fue el genotipo OTRO/OTRO presente en 17 de los 21 familiares. El genotipo  $\Delta F508$ /OTRO, fue determinado en 3 familiares y genotipo  $\Delta F508$ /  $\Delta F508$  en 1.



**Figura 19.** Gel agarosa al 1% conteniendo los productos de amplificación de 219 pb



**Figura 20.** Gel agarosa 3% mostrando los productos de digestión utilizado la enzima *MboI*



**Tabla N° 8. Frecuencia alélica relativa de la mutación  $\Delta F508$  en familiares de pacientes diagnosticados con FQ.**

<b>Mutación</b>	<b>Alelos totales</b>	<b>Número de alelos con <math>\Delta F508</math></b>	<b>Frecuencia Relativa de la mutación (%)</b>
$\Delta F508$	42	5	11.90

**Tabla N° 9. Frecuencia genotípica y alélica relativa de la mutación  $\Delta F508$  en familiares de pacientes con FQ.**

<b>Genotipo</b>	<b>Número de genotipos</b>	<b>Frecuencia genotípica relativa (%)</b>	<b>Número de alelos</b>	<b>Frecuencia alélica relativa (%)</b>
$\Delta F508/\Delta F508$	1	4.76	2	9.52
$\Delta F508/\text{OTRO}$	3	14.28	3	14.28

#### 4.4 Determinaciones bioquímicas

Tabla 10. Perfil lipídico y concentración de glucosa en familiares de pacientes con fibrosis quística.

Códigos	SEXO	EDAD	GLUCOSA	COLESTEROL	HDL	LDL	VLDL	TRIGLICERIDOS	$\Delta F$ 508
1	F	6	76.1	131.21	43.8	74.15	13.26	66.31	<sup>+</sup> <sup>b</sup>
2	F	37	89.7	158.92	46.2	87.28	25.44	127.21	-
3	M	40	201.4	235.49	36.1	156.37	43.02	215.12	<sup>+</sup> <sup>b</sup>
4	M	3	69.8	142.70	47.2	81.07	14.43	72.14	-
5	F	22	83.2	179.50	47.7	113.95	17.85	89.23	-
6	M	19	94.2	165.30	51.2	94.28	19.82	99.12	-
7	F	39	72.5	198.90	39.9	135.11	23.89	119.45	<sup>+</sup> <sup>b</sup>
8	F	19	71.3	162.83	41.1	91.89	29.84	149.21	<sup>+</sup> <sup>b</sup>
9	F	48	84.1	192.10	40.5	122.69	28.91	144.56	-
10	M	52	104.2	189.30	39.6	113.88	35.82	179.11	-
11	M	9	70.9	151.12	44.9	86.38	19.84	99.21	-
12	M	33	97.2	182.90	41.8	114.31	26.79	133.97	-
13	F	40	87.7	177.30	38.8	104.24	34.26	171.30	-
14	F	39	88.1	220.10	37.2	149.23	33.67	168.35	-
15	M	42	95.1	195.55	40.3	115.41	39.84	199.21	-
16	F	44	71.9	210.35	34.9	138.16	37.29	186.44	-
17	M	32	91.1	189.42	47.7	110.68	31.04	155.19	-
18	M	4	68.2	138.33	46.1	76.95	15.28	76.42	-
19	M	30	92.9	201.19	42.8	129.51	28.88	144.41	-
20	M	32	88.6	211.05	36.9	140.69	33.46	167.32	-
21	F	32	81.3	172.11	49.8	105.40	16.91	84.55	-

Mutación  $\Delta F 508$  a)  $+$ <sup>a</sup> = homocigoto      b)  $+$ <sup>b</sup> = heterocigoto

Tabla N° 11. Correlacion del perfil lipídico e Índice aterogenico en familiares de pacientes con FQ.

Códigos	SEXO	EDAD (años)	GLUCOSA (mg/dL)	COLESTEROL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	TRIGLICERIDOS (mg/dL)	ÍNDICE ATEROGENICO	$\Delta F508$
1	F	6	76.1	131.21	43.8	74.15	13.26	66.31	3.0	+
2	F	37	89.7	158.92	46.2	87.28	25.44	127.21	3.4	-
3	M	40	201.4	235.49	36.1	156.37	43.02	215.12	6.5	+
4	M	3	69.8	142.7	47.2	81.07	14.43	72.14	3.0	-
5	F	22	83.2	179.5	47.7	113.95	17.85	89.23	3.8	-
6	M	19	94.2	165.3	51.2	94.28	19.82	99.12	3.2	-
7	F	39	72.5	198.9	39.9	135.11	23.89	119.45	5.0	+
8	F	19	71.3	162.83	41.1	91.89	29.84	149.21	4.0	+
9	F	48	84.1	192.1	40.5	122.69	28.91	144.56	4.7	-
10	M	52	104.2	189.3	39.6	113.88	35.82	179.11	4.8	-
11	M	9	70.9	151.12	44.9	86.38	19.84	99.21	3.4	-
12	M	33	97.2	182.9	41.8	114.31	26.79	133.97	4.4	-
13	F	40	87.7	177.3	38.8	104.24	34.26	171.3	4.6	-
14	F	39	88.1	220.1	37.2	149.23	33.67	168.35	5.9	-
15	M	42	95.1	195.55	40.3	115.41	39.84	199.21	4.9	-
16	F	44	71.9	210.35	34.9	138.16	37.29	186.44	6.0	-
17	M	32	91.1	189.42	47.7	110.68	31.04	155.19	4.0	-
18	M	4	68.2	138.33	46.1	76.95	15.28	76.42	3.0	-
19	M	30	92.9	201.19	42.8	129.51	28.88	144.41	4.7	-
20	M	32	88.6	211.05	36.9	140.69	33.46	167.32	5.7	-
21	F	32	81.3	172.11	49.8	105.4	16.91	84.55	3.5	-

(+), presencia de la mutación  $\Delta F508$ ; (-), ausencia de la mutación  $\Delta F508$ .

Tabla 12. Estadística descriptiva de familiares de pacientes con fibrosis quísticas provenientes de la provincia de Lima según sexo, edad y parámetros bioquímicos.

	EDAD (años)		GLUCOSA (mg/dL)		COLESTEROL (mg/dL)		HDL (mg/dL)		LDL (mg/dL)		VLDL (mg/dL)		TRIGLICERIDOS (mg/dL)		ÍNDICE ATEROGENICO (CT/HDL)	
SEXO	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
PROMEDIO	30.4	32.6	90.7	80.6	185.7	180.3	41.9	42.0	115.3	112.2	28.6	26.1	142.8	130.7	4.3	4.4
MÁX.	52	48	201.4	89.7	235.5	220.1	51.2	49.8	156.4	149.2	43.0	37.3	215.1	186.4	6.5	6.0
MÍN.	3	6	68.2	71.3	138.3	131.2	34.9	34.9	77.0	74.2	14.4	13.3	72.1	66.3	3.0	3.0
DESV. EST	14.7	13.0	29.7	7.1	26.4	26.3	4.6	4.8	23.4	24.2	8.5	8.1	42.4	40.6	1.1	1.0

De los 21 participantes 11 fueron del sexo masculino (52.38 %) y 10 del sexo femenino (47.62%).

Según la edad en el caso del sexo femenino la media del grupo estudiado fue de 32.6 años, la edad mínima fue de 6 años y la máxima de 48 años con una desviación estándar de 13.0; para el sexo masculino la media fue de 30.4 años, la edad mínima fue de 3 años y la máxima de 52 años con una desviación estándar de 14.7

Además se pudo distribuir: 3 pacientes (14.28 %) correspondieron al grupo de 1 a 7.5 años de edad, 1 paciente (4.76 %) entre 7.5 y 12 años, 2 pacientes (9.52 %) entre 16.5 y 21 años, 1 paciente (4.76 %) entre 21 y 25.5 años, 1 paciente (4.76 %) entre 25.5 y 30 años, 4 pacientes (19.04%) entre 30 y 34.5 años, 3 pacientes (4.76 %) entre 34.5 y 39 años, 3 pacientes (4.76 %) entre 39 y 43.5 años, 2 pacientes (9.52 %) entre 43.5 y 48 años, 1 paciente (4.76 %) entre 48 y 52 años (Fig 21).

Los parámetros bioquímicos desarrollados indican para el sexo femenino una glucosa promedio de 80.6 mg/dL con una mínima de 71.3 mg/dL, una máxima de 89.7 mg/dL y una desviación estándar de 7.1 dado que la totalidad presento valores dentro de lo normal, para el sexo masculino una glucosa promedio de 90.7 mg/dL con una mínima de 68.2 mg/dL, una máxima de 201.4 mg/dL y una desviación estándar de 29.7 este valor se debe a que se encontró un diabético dentro del grupo con 201.4 mg/dL que disperso los valores.

El parámetro de Colesterol indica para el sexo femenino un promedio de 180.3 mg/dL con una mínima de 131.2 mg/dL, una máxima de 220.1 mg/dL y una desviación estándar de 26.3, para el sexo masculino un colesterol promedio de 185.7 mg/dL con una mínima de 138.3 mg/dL, una máxima de 235.5 mg/dL y una desviación estándar de 26.4

El HDL colesterol indica para el sexo femenino un promedio de 42.0 mg/dL, con una mínima de 34.9 mg/dL, una máxima de 49.8 mg/dL y una desviación estándar de 4.8, para el sexo masculino un HDL colesterol promedio de 41.9 mg/dL con una mínima de 34.9 mg/dL, una máxima de 51.2 mg/dL y una desviación estándar de 4.6

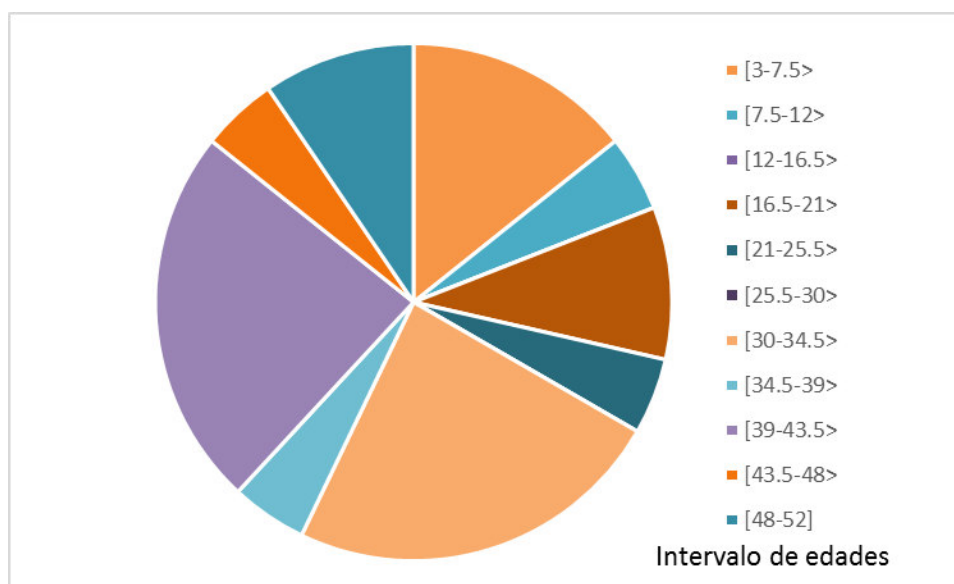
El LDL colesterol indica para el sexo femenino un promedio de 112.2 mg/dL, con una mínima de 74.2 mg/dL, una máxima de 149.2 mg/dL y una desviación estándar de 24.2,

para el sexo masculino un promedio de 115.3 mg/dL, con una mínima de 77.0 mg/dL, una máxima de 156.4 mg/dL y una desviación estándar de 23.4

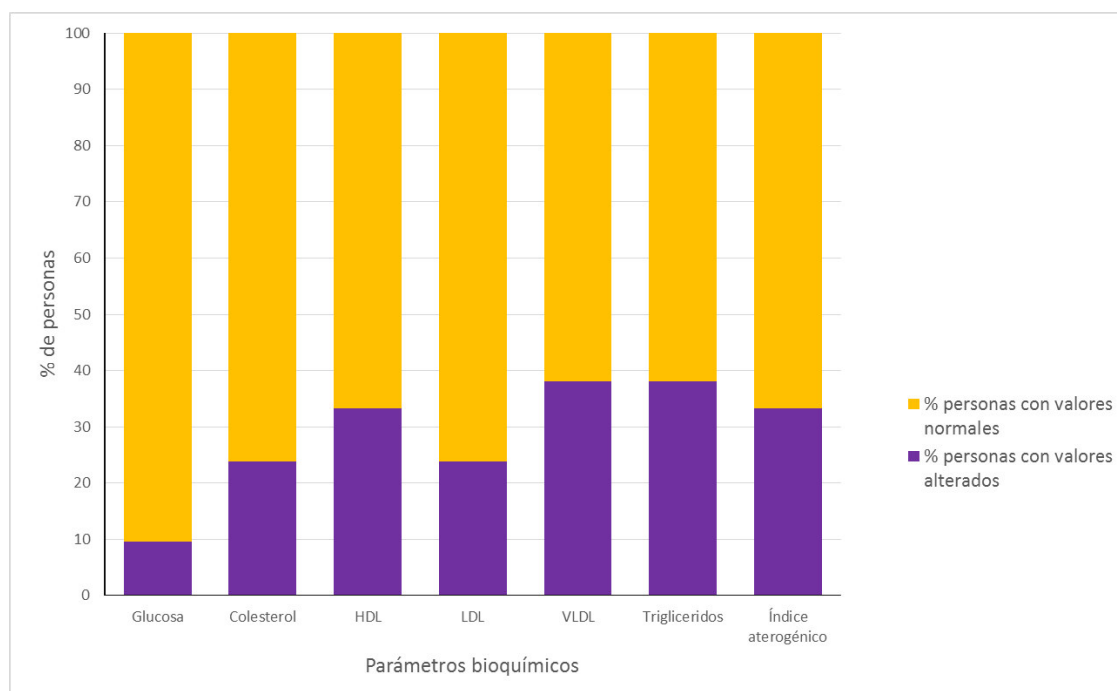
El VLDL colesterol indica para el sexo femenino un promedio de 26.1 mg/dL, con una mínima de 13.3 mg/dL, una máxima de 37.3 mg/dL y una desviación estándar de 8.1, para el sexo masculino un colesterol promedio de 28.6 mg/dL, con una mínima de 14.4 mg/dL, una máxima de 43.0 mg/dL y una desviación estándar de 8.5

Los Triglicéridos indican para el sexo femenino un promedio de 130.7 mg/dL, con una mínima de 66.3 mg/dL, una máxima de 186.4 mg/dL y una desviación estándar de 40.6, para el sexo masculino promedio de 142.8 mg/dL, con una mínima de 72.1 mg/dL, una máxima de 215.1 mg/dL y una desviación estándar de 42.4

El índice aterogénico relación CT/HDL indica para el sexo femenino un promedio de 4.4, con una mínima de 3.0, una máxima de 6.0 y una desviación estándar de 1.0, para el sexo masculino el índice aterogénico promedio es de 4.3, con una mínima de 3.0, una máxima de 6.5 y una desviación estándar de 1.1



**Figura 21. Distribución de familiares de pacientes con fibrosis quísticas provenientes de la provincia de Lima según edad.**



**Figura 22. Distribución porcentual de familiares de pacientes con fibrosis quística provenientes de la provincia de Lima según sexo y parámetros bioquímicos.**

El perfil lipídico de los familiares reveló hipertrigliceridemia en el 33,33% e hipercolesterolemia en el 23,8%.

En el 19,05 % de los familiares, se observó hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, los niveles séricos de lipoproteína de alta densidad (HDL) fueron (alto riesgo) menores de 35.0 mg/dL en 9,52 %.

Con respecto a los niveles de glucosa, los familiares presentaron valores aparentemente normales a excepción de un familiar que presentó 201.4 mg/dL de glucosa quien presentó la mutación **ΔF508**.

**Tabla N° 13 . Frecuencia relativa porcentual en familiares de pacientes con FQ según niveles de Colesterol.**

<b>Nivel de Colesterol</b>	<b>Número de familiares</b>	<b>Frecuencia relativa (%)</b>
Hipercolesterolemia ( $\geq 200$ mg/dL)	5	24.00
Normal ( $\leq 200$ mg/dL)	16	76.00
Total	21	100.00

**Tabla N° 14 . Frecuencia relativa porcentual en familiares de pacientes con FQ. Según niveles de HDL.**

<b>HDL-Colesterol</b>	<b>Número de familiares</b>	<b>Frecuencia relativa (%)</b>
Bajo Riesgo	20	95.00
Riesgo Standard	1	5.00
Total	21	100.00

**Tabla N° 15 . Frecuencia relativa porcentual en familiares de pacientes con FQ. Según niveles de Triglicéridos.**

<b>Nivel de triglicéridos</b>	<b>Número de familiares</b>	<b>Frecuencia relativa (%)</b>
Trigliceridemia ( $\geq 160$ mg/dL)	5	24.00
Normal	16	76.00
Total	21	100.00



## V. DISCUSIÓN

La mutación  $\Delta F508$  es la alteración molecular más frecuente en los pacientes con FQ. Varios estudios han demostrado una variación en la distribución de la mutación  $\Delta F508$  en diferentes poblaciones. Entre las poblaciones con mayor frecuencia reportada se encuentran: 88 % en Dinamarca, 80 % en Bélgica y Francia y 75 % en Norteamérica. En Europa esta frecuencia decrece progresivamente en la zona del Mediterráneo siendo de 48 a 50,6 % en España, 45 a 55 % en Italia y 20,3 a 27 % en Turquía.

El rastreo de la mutación  $\Delta F508$  en Latinoamérica resulta de particular interés, ya que es posible que este alelo haya sido introducido y diseminado a través de procesos de migración y mestizaje.

Así el primer reporte de la frecuencia del alelo  $\Delta F508$  para las comunidades latinoamericanas fue realizado en Argentina, en el cual se analizaron principalmente descendientes de italianos y de otros grupos europeos, con una frecuencia alelica  $\Delta F508$  de 63 %, en otro reporte más reciente se encontró una frecuencia de 57 %. En Brasil, la frecuencia promedio reportada es de 47 %, con marcada heterogeneidad intrapoblacional. En Cuba se ha reportado una frecuencia de 34 %, en Colombia varía entre 35,4 % y 48,0 % depende del departamento y región estudiada. En Chile la frecuencia es de 29,2 %.

En relación a estos países latinoamericanos, se observa que la frecuencia en este estudio es significativamente baja si se compara con la reportada en Argentina  $p < 0,001$  y Brasil<sup>38</sup>  $p < 0,01$ . Con respecto a Chile, Cuba y Colombia no se observaron diferencias significativas en la distribución del alelo  $\Delta F508$ . (Morales-Machin, A, et al, 2004).

Como se observa, la frecuencia de la mutación  $\Delta F508$  varía entre diferentes grupos poblacionales y étnicos. La variación de la frecuencia de esta mutación en Latinoamérica puede explicarse por el proceso de mestizaje iniciado después del descubrimiento de nuestro continente. Según reportes de varios investigadores la mayor fuente de mutaciones de FQ provino del Sur de Europa, que como se sabe tiene menor frecuencia de mutación  $\Delta F508$  en relación con el Norte de Europa.

La mezcla con población afrodescendiente también influyo en la variación observada, así como el ancestro indígena de las diferentes poblaciones que dieron origen a distintas ondas migratorias.

Según el origen geográfico de los alelos con la mutación  $\Delta F508$  en el gen CFTR, el cual fue determinado a través del lugar de nacimiento de los abuelos paternos y maternos de los afectados. En este caso, todos los familiares estudiados proceden del Departamento de Lima.

La población peruana es producto de un mestizaje entre españoles, africanos, asiáticos y amerindios; existiendo variaciones de una región a otra en relación al componente étnico que predomina en cada zona. En Perú según Silva (2008), revela una frecuencia relativa de la mutación  $\Delta F508$  en pacientes con Fibrosis Quística de 25 % diferente a las descritas para otros países de Latinoamérica. Esta, difiere de 11,90 % encontrada en familiares de pacientes con Fibrosis Quística de nuestro estudio. Esta diferencia entre las frecuencias de la mutación  $\Delta F508$  se puede explicar parcialmente por la heterogeneidad étnica y la distribución focal de los genes CFTR de los individuos de cada país o región.

Tal como se ha descrito, en la mayoría de las poblaciones estudiadas la mutación  $\Delta F508$  fue la más frecuente y el resto de las mutaciones se encontraron con frecuencias individuales. Los hallazgos descritos enfatizan la observación de que, para poblaciones heterogéneas, la proporción de mutaciones "comunes" identificadas es proporcional a la frecuencia relativa de la mutación  $\Delta F508$ , ya que la proporción contribuida por otros alelos es en general baja.

En el año 2009 se realizó un estudio de descripción clínica de pacientes con fibrosis quística en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en México y dentro de las pruebas desarrolladas se establecieron los valores de colesterol:  $116.18 \text{ mg/dL} \pm 33.4$  y triglicéridos:  $93.9 \text{ mg/dL} \pm 36.9$ .

Otro trabajo del 2011 en España, determino la resistencia insulínica en pacientes pediátricos con fibrosis quística y sobrepeso. De la población estudiada el 23.81 % presento hipercolesterolemia, de acuerdo al HDL el 95.24 % presento un riesgo standard y un 33.33 % hipertrigliceridemia.

De los heterocigotos identificados se encontró un 4.76 % con hipercolesterolemia y 4.76 % para hipertrigliceridemia. El homocigoto identificado resulto con valores normales en las pruebas bioquímicas por lo que no se estableció relación alguna. Por los datos obtenidos, no se puede establecer una relación significativa entre la condición de los pacientes y alteraciones metabólicas de los lípidos.

De ambos trabajos se concluyó que no hay alteración significativa sobre estos parámetros y esto además teniendo en cuenta que estos pacientes son tratados con dietas hipercalóricas y que además se enfrentan a un fenómeno que relaciona causalmente el aumento de la energía ingerida y la reducción de la actividad física. Esta tendencia en el estilo de vida no es exclusiva de la población sana, sino que afecta también a los pacientes con enfermedades crónicas.

Para nuestro estudio la baja frecuencia de la mutación  $\Delta F508$  requiere mayores investigaciones para diseñar nuevos métodos que sean utilizados para el diagnóstico o descarte de FQ.

La posibilidad actual de detectar alrededor de un tercio de las mutaciones mediante RFLP- PCR permite sugerir que el análisis molecular sea incluido en la evaluación clínica de los pacientes con FQ y sus familias, tanto para el diagnóstico y pronóstico como utilidad para el consejo genético, y con los avances de la farmacogenética, para el tratamiento de los pacientes en el futuro.

## VI. CONCLUSIONES

1. La frecuencia alélica de la mutación  $\Delta F508$  en 21 familiares de pacientes con Fibrosis Quística participantes en el estudio fue de 11,90 %.
2. Las frecuencias genotípicas de la mutación  $\Delta F508$  en 21 familiares de pacientes con FQ participantes en el estudio fueron  $\Delta F508/\Delta F508$  5% (1) y  $\Delta F508/OTRO$  14% (3).
3. No se puede establecer una relación significativa entre la condición de los pacientes (familiares de pacientes diagnosticados con fibrosis quística) y alteraciones metabólicas de los lípidos

## **VII. RECOMENDACIÓN**

- Continuar con los estudios a nivel molecular en mayor número de pacientes diagnosticados con FQ; así como, en poblaciones que étnicamente tengan características particulares para establecer las frecuencias correspondientes.
- Estos estudios poblacionales permitirán obtener la real frecuencia de enfermos y portadores, diagnosticar con anticipación, y utilizar como criterio dentro de programas de tamizaje neonatal, cuyos beneficios en los aspectos nutricionales son evidentes.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguirre I, et al (1994). Fibrosis quística: Reporte de casos en un hospital de Lima, Perú. *Rev Méd Hered* ; 5 (4):204-8.
2. Amaral MD. (2004)CFTR and chaperone:processing and degradation. *J Mol Neurosci*; 23:41 – 8
3. Andersen DH. (1938) .Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. A clinical and pathological study. *Am J Dis Child*; 56: 344-99.
4. Arzimanoglou II, Tuchman A, Li Z, Gilbert F, Denning C, Valverde K, et al (1995). Cystic fibrosis carrier screening in Hispanics. *Am J Hum Genet* ; 56: 544–7.
5. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology [Internet]. France: Jean-Loup Huret. University Hospital of Poitiers; 2012
6. Augarten A, Hacham S, Kerem E, Sheva Kerem B, Szeinberg A, Laufer J, et al (1995). The significance of sweat Cl/Na ratio in patients with borderline sweat test. *Pediatr Pulmonol*; 20: 369-71.
7. Bartlett JM, Stirling D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.*; 226: 3-6.
8. Bartlett JR, Friedman KJ, Ling SC, et al (2009). Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis. *JAMA*;302:1076-83.
9. Bhudhikanok GS, Jean Lim BA, Marcus R, et al (1996). Correlates of osteopenia in cystic fibrosis. *Pediatrics*; 97: 103-110.
10. Blackman SM, Hsu S, Ritter SE, et al (2009). A susceptibility gene for type 2 diabetes confers substantial risk for diabetes complicating cystic fibrosis. *Diabetologia*;52:1858-65.
11. Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL. (1995). Cystic Fibrosis In: Scriver, CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, New York: McGraw-Hill; 2649-80.
12. Boat TF. (2004). Fibrosis quística. Nelson-Behrman, *Tratado de Pediatría*. 17<sup>a</sup> ed. Madrid: Elsevier España SA; p. 1437-50.

13. Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM (2002). Cystic fibrosis: A world wide analysis of the CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2; 19: 575–606.
14. Boucher RC (2008). Enfermedades del aparato respiratorio. Fibrosis quística En: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al., eds. *Harrison Principios de Medicina Interna*. 17ª ed. p.253.
15. Boyer R. (2001). Conceptos de Bioquímica. International Thomson Editors, México: 396-398.
16. Brazova J, Sismova K, Vavrova V, et al.(2006). Polymorphisms of TGF-beta1 in cystic fibrosis patients. *Clin Immunol*;121:350-7.
17. Bremer LA, Blackman SM, Vanscoy LL, et al (2008). Interaction between a novel TGFB1 haplotype and CFTR genotype is associated with improved lung function in cystic fibrosis. *Hum Mol Genet* 2008;17:2228-37.
18. Cabrera G, Fernández-Burriel T, Cabrera P. (2003). Fibrosis quística en la edad adulta: nuevas formas clínicas. *Medmur Clin (Barc)*;120(15):584-8.
19. Campbell PW, 3rd, Parker RA, Roberts BT, Krishnamani MR, Phillips JA, 3rd. (1992). Association of poor clinical status and heavy exposure to tobacco smoke in patients with cystic fibrosis who are homozygous for the F508 deletion. *J Pediatr*;120:261-4.
20. Carson MR, Travis SM, Welsh MJ. (1995). The two nucleotide-binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J BiolChem*; 270: 1711-17.
21. Casals T, Ramos MD, Gimenez J.(1997). High heterogeneity for cystic fibrosis in spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. *Hum Genet*; 101:365-70.
22. Castaldo G, Tomaiuolo R, Vanacore B, et al. (2006). Phenotypic discordance in three siblings affected by atypical cystic fibrosis with the F508del/D614G genotype. *J Cyst Fibros*;5:193-5.
23. Castaños Cl, Rentería F, et al. (2008). Consenso Nacional de Fibrosis Quística; *Arch Argent Pediatr*; (Supl) 106(5):e01-52 / SAP. Subcomisiones, Comités y Grupos de Trabajo.

24. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, et al. (1990). Defective intracellular traffic and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*; 63: 827-834.
25. Chou JL, Rozmahel R, Tsui LC (1991). Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Biol Chem* ; 266: 24271-476.
26. Choy JY, et al (2001). Aberrant CFTR- dependent HC03-transport in mutation associated with cystic fibrosis. *Nature*; 410: 94-7.
27. Collaco JM, Cutting GR (2008). Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*; 14:559-66.
28. Collaco JM, Vanscoy L, Bremer L, et al (2008). Interactions between secondhand smoke and genes that affect cystic fibrosis lung disease. *JAMA* 2008;299:417-24.
29. Collazo T, et al (2004) Detección de las mutaciones 3120 +1g→A Y 3120g→A en pacientes cubanos con fibrosis quística. *Rev Cub Genet Hum* ; 2 (5).
30. Collins F, Drumm M, Cole J, Lockwood W, Vander-woude G, Lannuzzi M. (1987). Construction of a general human chromosome jumping library, with application to cystic fibrosis. *Science*; 235: 1046-9. 10.
31. Comeau AM, Accurso FJ, White TB, Campbell PW, Hoffman G, Parad RB, Wilfond BS, Rosenfeld M, Sontag MK, Massie J, Farrell PM, O'Sullivan BP. (2007). Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: Cystic Fibrosis Foundation workshop report. *Pediatrics* 119:e495-518.
32. Consortium TCFG-P(1993). Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*; 329:1308-13.
33. Conway S, Denton M. (2006). *Staphylococcus aureus* and MRSA. En: Bush A, Alton EFW, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A, eds. *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. Switzerland: Basel Karger; p. 153-9.
34. Corey M, McLaughlin FJ, Williams M, Levison H (1988). A comparison of survival, growth, and pulmonary function in patients with cystic fibrosis in Boston and Toronto. *J Clin Epidemiol* ; 41:583-91.



35. Cortés E. y Morcillo G (1999). Principios básicos de manipulación génica. Ingeniería genética. Programa de Formación del Profesorado. UNED
36. Cuppens H. (2012) Mutaciones en la fibrosis quística. En A.Salcedo,S.Gartner,R.M Giron, M.D García (Ed), Tratado de fibrosis quística.Barcelona, España: Justim S.L; 49 – 61
37. Cutting GR (2005). Modifier genetics: cystic fibrosis. Annu Rev Genomics Hum Genet;6:237-60.
38. Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perea GA, Shea E. (1953). Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Pediatrics; 12: 549-63.
39. Dipple KM, McCabe ER (2000). Modifier genes convert "simple" Mendelian disorders to complex traits. Mol Genet Metab;71:43-50.
40. Dorfman R, Li W, Sun L, et al (2009). Modifier gene study of meconium ileus in cystic fibrosis: statistical considerations and gene mapping results. Hum Genet.
41. Doull I (2001). Recent advances in cystic fibrosis. Arch Dis Child;85:62-6.
42. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, et al (2005). Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. N Engl J Med;353:1443-53.
43. Durno C, Corey M, Zielenski J,Tullis E, Tsui LC, Durie P.(2002).Genotype and phenotype correlation in patients With cystic fibrosis and pancreatitis. Gastroenterology;123: 1857-64.
44. Echeverría I, (2011) .Detección molecular de tres grandes deleciones del gen CFTR en pacientes fibroquísticos de la provincia de Buenos Aires (tesis de Maestría). Universidad Nacional de La Plata., Facultad de Ciencias Exactas, La Plata, Argentina.
45. Escalante R. (1998). Diagnóstico y tratamiento de fibrosis quística en el .Instituto de Salud del Niño 1991-1996 (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Lima, Perú.
46. Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C.(1936). Das coeliakiersyndrombe: Angeborener zystischer páncreas fibromatose und bronkiektasien.Wien Med Wochenschr; 86: 753

47. Farber D. (1944) .Pancreatic function and disease in early life. Arch Path; 37: 328.
48. Farrell PM, Kosciak RE(1996). Sweat chloride concentrations in infants homozygous or heterozygous for F 508 cystic fibrosis. Pediatrics 1996; 97: 524-8.
49. Farrell PM, Lai HJ, Li Z, et al (2005).Evidence on improved outcomes with early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening: enough is enough! J Pediatr;147:S30-6.
50. Fielbaum, O. (2011). Avances en fibrosis quística. Rev. med. clin. condes; 22(2) 150-159.
51. Gabolde M, Guilloud-Bataille M, Feingold J, Besmond C (1999). Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: cohort
52. García-Rojo M, Morillo-Castro A. (1999). Técnicas de Biología Molecular en el diagnóstico en Dermatología. Dermatología Peruana; 9(1):5-40.
53. Gibson LE, Cooke RE. (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. Pediatrics; 23: 545-9.
54. Girón .R. M, Salcedo. A y Casanova. Á.(2005).Antecedentes históricos y epidemiología. En Monografías Neumomadrid Fibrosis Quística (vol VIII, pp. 9 -20). Majadahonda :Madrid.
55. Grebe TA, Doane WW, Richter SF, Clericuzio C, Norman RA, Seltzer WK, et al. (1992). Mutation analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in Native American populations of the southwest. Am J Hum Genet; 51: 736–40.
56. Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin TL, Cutting GR (2002). Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of CFTR. N Engl J Med;347:401-7.
57. Gutierrez HH, Sanchez I, Schidlow DV. (2009). Cystic fibrosis care in Chile. Curr Opin Pulm Med.
58. Hammond KB, Turcios NL, Gibson LE.(1994). Clinicalevaluation of the macroduct sweats collection system and conductivity analyzer in the diagnosis of cystic fibrosis. J Pediatr; 124: 255-60.

59. Hiestad DM, Sorcher EJ, Huang Z, Wang Y, Haley BE. (1994). Use of 2-N<sup>3</sup>ATP to identify the site of ATP interaction on nucleotide binding domain-2 from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pediatr Pulmonol*; 10: 42.
60. Holl RW, Wolf A, Thon A, et al (1997). Insulin resistance with altered secretory kinetics and reduced proinsulin in cystic fibrosis patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 25: 188-193.
61. INEI (2008). Censos Nacionales 2007:XI de Población y VI de Vivienda. Primera Edición, Lima – Perú.  
<http://censos.inei.gob.pe/censos2007/documentos/ResultadoCPV2007.pdf>
62. Jarzabet K, Zbucka M, Pepinski W, Szamatowiez J, Domitrz J, Janica J, Wotezynski S, Szamatowiez M. (2004).Cystic fibrosis as a cause of infertility. *Reprod Biol*;2:119-29.
63. Keating C L, Liu X, DiMango E A. (2010).Classic respiratory disease but atypical diagnostic testing distinguishes adult presentation of cystic fibrosis. *Chest*.;137:1157-63.
64. Kerem BS, et al (1989).Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* ; 245: 1074–80
65. Kopelman H, Durie P, Gaskin K, et al. (1985). Pancreatic fluid secretion and protein hyperconcentration in cystic fibrosis. *N Engl J Med*; 312: 329-334.
66. Kovesi T, Corey M, Levison H (1993). Passive smoking and lung function in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*;148:1266-71.
67. Kristidis P, Bozon D, Corey M, et al. (1992).Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet*;50:1178-84.
68. Lago García I. (2009). Fibrosis Quística. Servicio Salud Metropolitano Norte. Hospital Clínico de niños Roberto del Río. *Rev. Ped.Elec [Internet]*.;6:2 - 18
69. Lai H, Kosorok M, Laxova A, et al. (2000).Nutricional status of patients with cystic fibrosis with meconium ileus. A comparison with patients without meconium ileus and diagnosed early through neonatal screening. *Pediatrics*; 105: 53-61.
70. Landeira .C, Barrio.M y Martínez. M.(2005).Diagnóstico. En *Monografías Neumomadrid Fibrosis Quística*. Majadahonda :Madrid; VIII: 141 - 154.

71. Lisker R, Ramirez E, Pérez–Briceño R, Granados J, Babinsky V. (1990).Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol*; 62: 791–801.
72. Mahadeva R, Webb K, Westerbeek RC, et al (1998).Clinical outcome in relation to care in centres specialising in cystic fibrosis: cross sectional study. *BMJ*;316:1771-5.
73. Mall M, Boucher RC. (2006).Pathogenesis of pulmonary disease in cysticfibrosis. En: Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, JaffeA, eds. *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. Switzerland: Basel Karger; p. 116-21.
74. Mansoura MK, Smith SS, Choi AD, Richards NW, Strong TV, Drum ML, et al. (1998). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) anion binding has a probe of the pore. *Biophys J*; 74: 1320-32.
75. Martina, P.(2013). Epidemiología y evolución de aislados clínicos pertenecientes al Complejo Burkholderia cepacia recuperados del tracto respiratorio de pacientes fibroquísticos. (Tesis doctoral) Universidad Nacional De La Plata; Buenos Aires – Argentina
76. Martina, P.(2013). Epidemiología y evolución de aislados clínicos pertenecientes al Complejo Burkholderia cepacia recuperados del tracto respiratorio de pacientes fibroquísticos. (Tesis doctoral) Universidad Nacional De La Plata; Buenos Aires – Argentina.
77. Mateus H, et al.(2007). Frecuencia de la mutación F508del en estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia; *Colomb Med*; 38(4): 352-356.
78. McPhail GL, Acton JD, Fenchel MC, Amin RS, Seid M. (2008).Improvements in lung function outcomes in children with cystic fibrosis are associated with better nutrition, fewer chronic pseudomonas aeruginosa infections, and dornase alfa use. *J Pediatr*;153:752-7.
79. Mishra A, Greaves R, Massie J (2006). Sweat electrolytes: establishing a reference range in adolescents and adults (abstract). *Aust J Med Sci*;27:171.
80. Mishra A, Greaves R, Smith K, Carlin JB, Wootton A, Stirling R, Massie J. (2008). Diagnosis of Cystic Fibrosis by Sweat Testing: Age-Specific Reference Intervals. *The Journal of pediatrics* 153:758–763.

81. Molano J & Barreiro T (2012). El canal de iones cloruro CFTR. En A.Salcedo,S.Gartner,R.M Giron, M.D García (Ed), Tratado de fibrosis quística Barcelona, España: Justim S.L;1:41 – 47.
82. Morales,P &Sánchez,E (2012). Identificación, estructura y expresión del gen CFTR. En A.Salcedo,S.Gartner,R.M Giron, M.D García (Ed), Tratado de fibrosis quística (pp. 29 - 40). Barcelona, España: Justim S.L.
83. Morales-Machin, A, et al.(2004). Frecuencia de la mutación  $\Delta f508$  en pacientes Venezolanos afectados con Fibrosis Quística. Investigación Clínica, 45(2), 121-130.
84. Moran A, Diem P, Klein DJ, Levitt MD, Robertson RP (1991).Pancreatic endocrine function in cystic fibrosis. J Pediatr; 118: 715-23.
85. Morral N, Dotk T, Dziadek V, Llevadot R, Feree C.(1994).Patterns of haplotypes for 92 cystic fibrosis mutations: variability, association and recurrence. Am J Hum Genet; 55:918
86. Murray J, Cuckle H, Taylor G, Littlewood J, Hewison J (1999). Screening for cystic fibrosis. Health Technol Assess.;3(8):i-iv, 1-104.
87. Nathanson I, Tucker M, Jones L.(1994). Measurement of chloride concentration in microvolume samples of sweat. Pediatr Pulmonol ;17: 340-2.
88. Ninis VN, Kylync MO, Kandemir M, Dadly E, Tolum A. (2003). High frequency of T9 and CFTR mutations in children with idiopathic bronchiectasis. J Med Genet; 40:530-5.
89. Niu T, Quin ZS, Xu X, Liu JS.(2002). Bayesian haplotype inference for multiple linked single – nucleotide polymorphisms. Am J Hum Genet; 70: 157 – 69.
90. Olesen HV, Jensenius JC, Steffensen R, Thiel S, Schiotz PO. (2006).The mannan-binding lectin pathway and lung disease in cystic fibrosis--disfunction of mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) may be a major modifier. Clin Immunol;121:324-31.
91. Orozco L, González L, Chavez M, Velazquez R, Lezana JL, Saldaña Y, et al. (2001) XV–2c/KM–19 haplotype analysis of cystic fibrosis mutations in Mexican patients. Am J Med Genet 2; 102: 277–81.
92. Orozco L, Velazquez R, Zielenski J, Tsui LC, Chavez M, Lezana JL, et al.(2000). Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification

- of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297–1G A). *Hum Genet* ; 106: 360–5
93. Orozco L., et al. (2006). Fibrosis Quística: la frontera del conocimiento molecular y sus aplicaciones clínicas. *Rev Invest Clín* ;58(2):139 -152.
  94. Paz L. (2013). Cribado neonatal de fibrosis quística. Eficacia/efectividad y protocolos de implementación. Santiago de Compostela: Axencia de Avaliacion de Tecnoloxias Sanitarias de Galicia, avalia-t. Madrid. España.
  95. Perez-Aguilar F, Berenguer J. (1998). Fibrosis quística y aparato digestivo: consideraciones fisiopatológicas, clínicas y terapéuticas. *Med. Clin (Barc)*; 111 (13):508-15.
  96. Perez-Aguilar F, Berenguer J. (1998). Fibrosis quística y aparato digestivo: consideraciones fisiopatológicas, clínicas y terapéuticas. *Med. Clin (Barc)*; 111 (13):508-15.
  97. Ranieri E, Lewis BD, Gerace RL, Ryall RG, Morris CP, Nelson P V., Carey WF, Robertson EF. (1994). Neonatal screening for cystic fibrosis using immunoreactive trypsinogen and direct gene analysis: four years' experience. *BMJ* 308:1469–72.
  98. Ratjen F, Döring G (2003). Cystic fibrosis. *Semin. Lancet.*; 361: 681-689.
  99. Rave-Harel N, Madgar I, Goshen R, Nissim-Rafinia N, Ziadni A, Rahat A, et al. (1995) CFTR haplotype analysis reveals genetic heterogeneity in the etiology congenital bilateral aplasia of the vas deferens. *Am J Hum Genet*; 56:1359-66.
  100. Restrepo MC, Pineda L, Rojas-Martínez A, Gutiérrez CA, Morales A, Gómez Y, et al. (2000). CFTR mutations in three Latin American countries. *Am J Med Genet*; 91: 4, 277-9
  101. Riordan JR, Alon N, Grzelczak Z, Dubel S, Sun S (1991). The CF gene product as a member of a membrane transporter (TM6–NBF) superfamily. *Adv Exp Med Biol* ; 290: 19–29.
  102. Riordan JR, et al (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science*; 245: 1066-72.
  103. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*; 245(4922):1066-73.

- 104.Roldán A.M (2013). Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante tripsina inmunorreactiva (Tesis de pregrado)"Universidad Miguel Hernández,Depto. de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica;Alicante-España.
- 105.Rommers JM, et al.(1989).Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science; 245:1059 -65.
- 106.Rosenstein BJ, Cutting GR, (1998) for the Cystic Fibrosis Consensus Panel. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. J Pediatr;132:589-95.
- 107.Rowntree R, Harris A.(2002) DNA polymorphisms in potential regulatory elements of the CFTR gene alter transcription factor binding. Hum Genet ; 111: 66–74
- 108.Rowntree RK and Harris A (2003). The phenotypic consequences of CFTR mutations. Ann Hum Genet;67:471-85.
- 109.Schechter MS, Shelton BJ, Margolis PA, Fitzsimmons SC (2001). The association of socioeconomic status with outcomes in cystic fibrosis patients in the United States. Am J Respir Crit Care Med;163:1331-7.
- 110.Shepherd R, Thompson M, Greer R, et al (1999). Factors affecting nutrition in early cystic fibrosis: Resting energy expenditure, pulmonary inflammatory markers, body composition and genotype in a neonatally screened population. Pediatric Pulmonol; 28: 260-274.
- 111.Sheppard ND, Ostedgaard SL.(1996). Understanding how cystic fibrosis mutations caused a loss of chloride channel function.Mol Med Today; 290-7.
- 112.Shwachman H, Dunham R, Phillips WR. (1963).Electrical conductivity of sweat, a simple diagnosis test in children. Pediatrics; 32:85-8
- 113.Silva Acuña,C. (2008). Mutaciones más frecuentes en el gen CFTR de pacientes diagnosticados con fibrosis quística del Instituto Especializado de Salud del Niño (tesis de pregrado).Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Lima, Perú
- 114.Sojo Aguirre A, Heredia González S. Insuficiencia pancreática exocrina, fisiopatología, clínica y tratamiento. En: Salcedo Posadas A, Gartner S, Girón Moreno RM, García Novo MD, editores. Tratado de Fibrosis Quística. 1ª ed. Madrid: Justim S.L; 2012. p.325-338.

115. Solari A. (2004). *Genética Humana*. 3era edición, Editorial Médica Panamericana, Argentina. Págs. 187-191.
116. T Sui L, et al. (1985). Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science*;29:1054 -7
117. Thorpe-Beeston JG (2006). Fertility, contraception, incontinence and pregnancy. En: Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A, eds. *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. Switzerland: Basel Karger; p. 264-9.
118. Tori CA. (1966). *Enfermedad fibroquística del páncreas (mucoviscidosis)* (Tesis de Pregrado). Universidad Peruana Cayetano Heredia; Lima
119. Torres, D. (2002). Estudio Clínico Epidemiológico de la Fibrosis Quística en el Instituto de Salud del Niño, Lima 1991 – 2001; *Paediatrica*: 4(3): 7- 15.
120. Vaglio, A. et al. (2011). Limitaciones de los estudios de genética molecular en el proceso diagnóstico de fibrosis quística. *Rev Med Urug* ; 27(3): 129-137
121. Vankeerberghen A, Wei L, Jaspers M, Cassiman JJ, Nilius B and Cuppens H. (1998). Characterization of 19 disease-associated missense mutations in the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Hum Mol Genet*; 7:1761-9.
122. Vásquez, C, Baranda, F (2012). Diagnóstico y seguimiento de la fibrosis quística. En A. Salcedo, S. Gartner, R. M. Giron, M. D. García (Ed), *Tratado de fibrosis quística*. Barcelona, España: Justim S.L; 108 -122
123. Vega-Briceño L. E., Sánchez Ignacio (2006). Aspectos básicos de la Fibrosis Quística. *Neumología Pediátrica*, 1(3), 95 -158.
124. Welsh MJ. (2004). Cystic fibrosis. *Cecil-Goldman. Textbook of Medicine*. 22<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Saunders; p. 515-9.
125. Westaby M (2006). Cystic fibrosis: liver disease. En: Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A, eds. *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. Switzerland: Basel Karger; p. 251-63.
126. Yoshimura K, et al (1991). The cystic fibrosis gene has a "housekeeping"-type promoter and is expressed at low levels in cells of epithelial origin. *J Biol Chem* ; 226: 9140-4



127. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z (1991). Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* ; 10: 214–28.
128. Zielenski J, Tsui LC (1995). Cystic fibrosis: Genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* ; 29: 777–807.